



UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MEDIADORES IMUNITÁRIOS EM AMOSTRAS DE
CETÁCEOS CAPTURADOS ACIDENTALMENTE EM PORTUGAL CONTINENTAL

PEDRO MIGUEL VERDELHO GONÇALVES

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Fernando Jorge Silvano Boinas
Doutora Ana Isabel Simões Pereira
Duarte
Doutora Solange Judite Roque Coelho
Alves Gil

ORIENTADORA

Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte

2016

LISBOA



UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MEDIADORES IMUNITÁRIOS EM AMOSTRAS DE
CETÁCEOS CAPTURADOS ACIDENTALMENTE EM PORTUGAL CONTINENTAL

PEDRO MIGUEL VERDELHO GONÇALVES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Fernando Jorge Silvano Boinas

Doutora Ana Isabel Simões Pereira

Duarte

Doutora Solange Judite Roque Coelho

Alves Gil

ORIENTADORA

Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte

2016

LISBOA

Para a minha mãe

Agradecimentos

À Professora Doutora Ana Duarte, pela disponibilidade, incentivo, apoio e transmissão de conhecimentos que me levaram a escolher esta área e me auxiliaram ao longo deste percurso.

À Dr.^a Carolina Bento, por toda a paciência, ensinamentos, disponibilidade e principalmente por toda a ajuda e pela confiança que depositou em mim para fazer parte do seu projeto.

Ao Dr. João Cota, por toda a ajuda, paciência, conselhos e ensinamentos.

À Carla Cartaxeiro, pela boa disposição, pela companhia, pelos conselhos e por toda a ajuda.

Ao Dr. Ferdinando de Freitas e todo o pessoal do laboratório de Doenças Infecciosas, pela disponibilidade, boa disposição e por todas as vezes que emprestaram material.

A todo o pessoal do CIISA, por toda a companhia e ajuda.

Aos meus colegas de estágio e amigos, Inês Félix, João Marques e João Vistas; todos os colegas e amigos da faculdade e a todos os meus amigos da Margem Sul, por todo o apoio, companheirismo e por tudo o que me ensinaram. Obrigado por tornarem tudo mais fácil.

À Nês, por estar sempre comigo em todos os momentos, por todo o amor e por todo o apoio e pela força que me dá.

À minha mãe e aos meus tios por estarem sempre preocupados, pela paciência, por acreditarem em mim e por me terem apoiado sempre ao longo de todo este percurso.

Ao meu pai e às minhas irmãs pelo apoio que me dão.

Aos Contraluz, por manterem a música na minha vida.

Resumo

Avaliação da Expressão de Mediadores Imunitários em Amostras de Cetáceos Capturados em Portugal Continental

Os golfinhos comuns (*Delphinus delphi*) são animais sentinela para avaliação da integridade dos ecossistemas marinhos, protegidos ao abrigo da lei. Compreender o funcionamento do seu sistema imunitário é essencial, mas a sua captura premeditada é proibida. Através do estudo da expressão de citocinas em amostras recolhidas na necrópsia de animais capturados acidentalmente é possível determinar os elementos do sistema imunitário em ação. Com o objetivo de criar um grupo controlo para analisar o perfil de resposta a morbilivirus dos cetáceos (CeMV), foram recolhidas amostras de linfonodo pulmonar e pulmão de 15 animais negativos ao vírus. Foi extraído o mRNA e analisada a expressão das Interleucinas (IL)-1 β , 4, 6, 10, 12 e Fator de Necrose Tumoral (TNF) por PCR quantitativo. A expressão no pulmão foi heterogénea entre animais, verificando-se uma grande variação na expressão de IL-4, IL-12 e IL-1 β , devido à exposição deste órgão ao meio exterior. A expressão no linfonodo foi homogénea entre animais, havendo uma expressão mais acentuada de TNF- α e IL-1 β em relação às outras citocinas, consistente com processos de inflamação aguda. Este estudo preliminar sugere a possibilidade de criar um grupo controlo a partir de animais de vida livre com amostras de linfonodo, mas não com amostras de pulmão, com aplicabilidade em estudos futuros tais como a avaliação de expressão de citocinas em golfinhos infetados com CeMV.

Palavras-chave: *Delphinus delphis*; sentinela; citocina; qPCR; grupo controlo; pulmão; linfonodo pulmonar

Abstract

Evaluating the Expression of Immune Response Mediators in Samples from Accidentally Captured Cetaceans in the Portuguese Continental Coast

Common dolphins (*Delphinus delphi*) are sentinel animals for assessing the integrity of marine ecosystems, protected under the law. Understanding their immune system is essential, but their deliberate capture is prohibited. Through the study of cytokine expression in samples collected at necropsy from animals caught accidentally it is possible to determine the acting elements of the immune system. In order to create a control group for the study of Cetacean Morbillivirus (CeMV) response profile, pulmonary lymph node and lung samples were collected from 15 animals negative to the virus. mRNA was extracted and the expression of interleukins (IL)-1 β , 4, 6, 10, 12 and Tumor Necrosis Factor (TNF) was analyzed by quantitative PCR. The expression in the lung was heterogeneous among animals, with a wide variation in IL-4 expression, IL-12 and IL-1 β due to the organ's exposure to the external environment. The expression in lymph nodes was homogeneous among animals, with a higher expression of TNF- α and IL-1 β compared to other cytokines, consistent with acute inflammation processes. This preliminary study suggests the possibility of creating a control group from free roaming animals with lymph node samples, but not with lung samples, with applicability in future studies including the evaluation of cytokine expression in CeMV infected dolphins.

Keywords: *Delphinus delphis*; sentinel; cytokine; qPCR; control group; lung; pulmonar lymph node

Índice Geral

Agradecimentos.....	II
Resumo	III
Abstract	IV
Índice de Tabelas	VII
Índice de Figuras	VIII
Índice de Gráficos	IX
Índice de Equações	X
Índice de Abreviaturas	XI
1. Descrição das atividades de estágio.....	1
2. Introdução.....	2
2.1. Sentinelas.....	3
2.2. Ecologia dos cetáceos.....	3
2.3. Sistemas de vigilância	4
2.4. Imunologia.....	5
2.4.1. Caracterização geral do Sistema Imunitário.....	6
2.4.2. Citoquinas	7
2.4.2.1. Processos que antecedem a produção de citoquinas	8
2.4.2.2. Citoquinas Pro-inflamatórias – TNF- α , IL-1, IL-6	10
2.4.2.2.1. TNF- α	10
2.4.2.2.2. IL-1.....	12
2.4.2.2.3. IL-6.....	13
2.4.2.3. Citoquinas da resposta Celular – IL12, IL2 e IFN- γ (TNF- α).....	15
2.4.2.3.1. IL-12.....	15
2.4.2.3.2. IL-2	17
2.4.2.3.3. IFN- γ	18
2.4.2.4. Citoquinas da resposta Humoral – IL4, IL13, IL10, IL5 (IL1 e IL6).....	21
2.4.2.4.1. IL-4	21
2.4.2.4.2. IL-10.....	22
2.4.2.4.3. IL-13.....	25
2.4.2.4.4. IL-5	26
3. Objetivos.....	27
4. Materiais e Métodos	29
4.1. População animal e amostragem	29
4.2. Seleção dos animais	29
4.3. Preparação e recolha de amostras.....	30
4.4. Técnica laboratorial	30
4.4.1. Extração RNA.....	30
4.4.2. Tratamento com DNase.....	30
4.4.3. Transcrição Reversa.....	30
4.4.4. Escolha de primers	31
4.4.5. qPCR/PCR convencional.....	32
4.4.6. Purificação dos produtos	33
4.4.7. A tailing.....	33
4.4.8. Ligação (pGEM)	34
4.4.9. Transformação	34
4.4.10. Seleção de recombinantes por qPCR	35
4.4.11. Stock de bactérias	35
4.4.12. Extração de DNA plasmídico	35
4.5. Sequenciação	36
4.6. Curva standard	36
4.7. Análise dos dados	36
4.8. Análise estatística	37
5. Resultados.....	38
5.1. Seleção do gene referência	38
5.2. Método do “ $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ”	39

5.2.1.	Eficiências dos Primers.....	39
5.2.2.	Análise de expressão.....	40
5.2.2.1.	Diferenças de expressão entre citocinas no linfonodo	40
5.2.2.2.	Diferenças de expressão entre citocinas no pulmão	40
5.2.2.3.	Diferenças de expressão entre Pulmão e Linfonodo	40
5.3.	Método do algoritmo “Miner”	41
5.3.1.	Diferenças de expressão entre citocinas no linfonodo	41
5.3.2.	Diferenças de expressão entre citocinas no pulmão	41
5.3.3.	Diferenças de expressão entre Pulmão e Linfonodo	41
6.	Discussão	43
6.1.	Padronização do protocolo experimental	43
6.2.	Discussão dos Resultados	43
7.	Conclusão.....	45
	Bibliografia	46
	ANEXOS.....	71
	ANEXO 1 – Fichas de necropsias	71
	ANEXO 2 - Amostras de Animais Positivos a CeMV	73
	ANEXO 3 – Tabelas das eficiências	74
	ANEXO 4 – Tabela de expressão relativa de citocinas (Método $2^{-\Delta\Delta C_t}$).....	76
	ANEXO 5 - Expressão relativa de citocinas (Método Miner)	77
	ANEXO 6 - Análise da normalidade (Método $2^{-\Delta\Delta C_t}$).....	78
	ANEXO 7 - Análise da normalidade (Método Miner)	78
	ANEXO 8 – Primers que não funcionaram	79
	ANEXO 9 – Abstract do Poster a ser apresentado em Atlanta	80

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Primers	31
Tabela 2 - Esquema Placa qPCR	32
ANEXO 1 - Ficha de necrópsias - Pulmões	71
ANEXO 1 - Ficha de Necrópsias - Linfonodo Pulmonar	72
ANEXO 2 - Amostras de Animais Positivos a CeMV	73
ANEXO 3 - Eficiência dos Primers RPL7	74
ANEXO 3 - Eficiência dos Primers TNFalfa.....	74
ANEXO 3 - Eficiência dos Primers IL-6	75
ANEXO 3 - Eficiência dos Primers IL-4	75
ANEXO 3 - Eficiência dos Primers IL-10	75
ANEXO 4 - Expressão relativa de citocinas (Método 2- $\Delta\Delta C_t$).....	76
ANEXO 5 - Expressão relativa de citocinas (Método Miner)	77
ANEXO 6 - Análise da normalidade (Método 2- $\Delta\Delta C_t$).....	78
ANEXO 7 - Análise da normalidade (Método Miner)	78
ANEXO 8 - Primers que não funcionaram.....	79

Índice de Figuras

Figura 1 - Distribuição geográfica da população mundial de <i>Delphinus delphi</i>	4
Figura 2 - Esquema geral da sinalização da resposta adaptativa	7
Figura 3 - Sinalização PAMP-TLR	8
Figura 4 - Sinalização celular APC-Th	10
Figura 5 - Distribuição das capturas acidentais por distrito	29
Figura 6 - Mapa pGEM-T Easy Vector	33

Índice de Gráficos

Gráfico 1 - Curvas de Amplificação e Dissociação do RPL7 e YWHAZ.....	38
Gráfico 2 - Eficiência Primers RPL7	39
Gráfico 3 - Eficiência Primers YWHAZ.....	39
Gráfico 4 - Eficiência Primers TNF- α	39
Gráfico 5 - Eficiência Primers IL-6.....	39
Gráfico 6 - Eficiência Primers IL-4.....	39
Gráfico 7 - Eficiência Primers IL-10.....	39
Gráfico 8 - Expressão média das citocinas nos dois órgãos (método $2^{-\Delta\Delta C_t}$)	40
Gráfico 9 - Expressão média das citocinas nos dois órgãos (método Miner)	42

Índice de Equações

Equação 1 - Ng de Insert	34
Equação 2 – N° de Moléculas	36
Equação 3 - Eficiência dos primers	36
Equação 4 - Amplificação exponencial do PCR	36
Equação 5 – Linearização do ΔCt	37
Equação 6 - Linearização dos $\Delta\Delta Ct$	37

Índice de Abreviaturas

ACTH - Hormona Adrenocorticotrófica
APC - Células Apresentadoras de Antígenos
BCDF - B cell Differentiation Factor
BCGF - B cell Growth Factor
Bcl-2 - B-cell lymphoma 2
BSF - B cell stimulatory factor
BSF - B cell Stimulatory Factor
B-TCGF - B cell-derived T cell Growth Factor
CBI - Comissão Baleeira Internacional
CD - Cluster of Differentiation
cDNA - DNA complementar
CeMV – Cetacean Morbillivirus
CIAM - Comissão Interministerial para os Assuntos do Mar
CLMF - Cytotoxic Lymphocyte Maturation Factor
COX - Ciclo-oxigenase
CRP – Proteína C Reativa
CSIF - Cytokine Synthesis Inhibitory Factor
DC - Células Dendríticas
DIF - Differentiation-inducing factor
DNA - Acido Desoxirribonucleico
DQEM - Directiva Quadro Estratégia Marinha
EDF - Eosinophil Differentiation Factor
EMAM - Estrutura de Missão para Assuntos do Mar
ENM - Estratégia Nacional para o Mar
Eo-CSF - Eosinophil Colony-stimulating Factor
EP - Endogenous Pyrogen
fMLP-R - Formyl Peptide Receptor
GADPH - Glyceraldehyde 3-phosphate Dehydrogenase gene
GM-CSF - Granulocyte-macrophage Colony-stimulating Factor
HP - Haptoglobina
HPGF - Hybridoma Plasmocytoma Growth Factor
HSF - Hepatocyte Stimulating Factor
HSP70 - Heat Shock Protein 70
ICAM - Intercellular Adhesion Molecule
ICNF - Instituto de conservação da Natureza e Florestas
IDO - indomeleamine-2,3-dioxygenase
IFN - Interferão
Ig - Imunoglobulina
IL - Interleucina
LAF - Lymphocyte-activating Factor
LEM - Leukocyte Endogenous Mediator
LPS - Lipopolissacarídeo
M1 - Macrófagos ativados pro-inflamatórios
MAF - Macrophage Activating Factor
MCF - Mononuclear Cell Factor
MCP - Monocyte Chemoattractant Protein
M-CSF - Macrophage Colony-stimulating Factor
MCSF - Mast Cell Growth Factor
MGI-2 - Monocyte-granulocyte Inducer
MHC - Complexo Maior de Histocompatibilidade
MIP - Macrophage Inflammatory Protein
mRNA - RNA mensageiro
MT2 - Metalotioneína 2
NF-AT - Fator Nuclear de linfócitos T ativados

NF-kB - Fator Nuclear kB
 NK - Natural Killer
 NKSF - Natural Killer cell Stimulatory Factor
 NLR - Recetores tipo NOD
 NO - Óxido Nítrico
 NOD - Nucleotide-binding and Oligomerization Domain
 NOS - Nitric Oxide Synthase
 PACAP - Pituitary Adenylate Cyclase-activating Polypeptide
 PAF-R - Platelet-activating Factor Receptor
 PAMP - Padrões Moleculares associados a agentes patogénicos
 PCB - Polychlorinated biphenyl
 PDGF - Platelet-derived Growth Factor
 PGE2 - Prostaglandina E2
 PMP - Plano Mar Portugal
 RANTES - Regulated on Activation Normal T cell Expressed and Secreted
 RNA - Ácido Ribonucleico
 RPL7 - 60S Ribosomal Protein L7 gene
 SI - Sistema Imunitário
 SNC - Sistema Nervoso Central
 SPVS - Sociedade Portuguesa de Vida Selvagem
 T3 - Triiodotironina
 TCGF - T cell Growth Factor
 TCMF - Cytolytic T Lymphocytes Maturation Factor
 TCR – Recetores de antígenos dos linfócitos T
 TGF - Transforming Growth Factor
 Th - T Helper - T auxiliares
 TK - Tirosina Quinase
 TLR - Recetores tipo Toll
 TNF - Fator de Necrose Tumoral
 TNFSF2 - TNF Ligand Superfamily Member 2
 TRF - T cell Replacing Factor-like Factor
 TRF - T cell-replacing Factor
 TSF - T cell-stimulating Factor
 TSH - Tireotrofina, Hormona Estimulante da Tireoide
 VCAM - Vascular cell Adhesion Molecule
 VEGF - Vascular endothelial growth factor
 VIP - Vasoactive Intestinal Peptide
 VLA - Very Late Antigen
 YWHAZ - Tyrosine 3-monooxygenase/Tryptophan 5-monooxygenase Activation Protein Zeta

1. Descrição das atividades de estágio

As atividades do estágio curricular obrigatório para a obtenção do grau Mestre em Medicina Veterinária decorreram no Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA) da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, num período decorrido entre Outubro de 2014 e Maio de 2015, perfazendo um total de aproximadamente 960 horas de trabalho. Foram realizadas em colaboração com o doutoramento em Ciências Veterinárias da Dra. Carolina Bento (FMV-ULisboa), desenvolvido no âmbito do projeto CetSensi - Cetáceos como organismos sentinelas da saúde do meio marinho (RECI/AAG-GLO/0470/2012), tendo como instituição de acolhimento a Universidade de Aveiro e contando com a colaboração da FMV-UL, da Universidade do Minho, da Coordenadora para o Estudo de Mamíferos Mariños (CEMMA – Galiza) e da Sociedade Portuguesa de Vida Selvagem (SPVS). Os resultados obtidos contribuíram também para a elaboração de um *poster* “Health Assessment in Free Roaming Cetaceans: Determining Baseline Levels for Cytokine Expression in Common Dolphins” a ser apresentado em Julho de 2016 na 2016 Joint AAZV/EAZWV/IZW Conference em Atlanta (ANEXO 9).

O trabalho de investigação laboratorial consistiu na avaliação de perfis de expressão de diversas citocinas em amostras de golfinhos comuns previamente recolhidas, tendo sido utilizadas técnicas de biologia molecular, incluindo extração e purificação de ácidos nucleicos, eletroforese em gel de agarose, PCR quantitativo, clonagem em plasmídeo recombinante, entre outras.

Foi também possível acompanhar outros projetos como a investigação sobre sapos invasores de Madagáscar como potenciais vetores de agentes patogénicos e investigação sobre o Papilomavirus Bovino tipo 2 realizados pelos meus colegas Inês Félix e João Marques, respetivamente, alargando o espectro de aprendizagens e enriquecendo a experiência do estágio.

2. Introdução

Desde o início dos tempos que existe uma enorme ligação entre o ser humano e o mar, seja para procura de alimento, local de lazer, meio de deslocação, etc. No que diz respeito à sanidade, esta ligação também existe, porque perigos para a saúde dos oceanos podem ter consequências diretas e indiretas para a saúde humana. Muitas das doenças emergentes nos ecossistemas marinhos são zoonóticas (ex: tuberculose, leptospirose, brucelose, etc.), apresentando um elevado risco para a saúde humana; muitos dos contaminantes tais como metais pesados como o mercúrio, que lançamos para o oceano vão sendo transferidos ao longo da cadeia alimentar sofrendo bioacumulação, muitas vezes em animais que fazem parte da dieta humana. O consumo de peixe tem vindo a aumentar ao longo dos anos a nível mundial, estando nos 19,2kg *per capita* em 2012 e a grande percentagem continua a advir da pesca oceânica. Em 2011, a quantidade de peixe pescado nos oceanos bateu um record histórico, alcançando cerca de 93,7 milhões de toneladas, tendo mantido níveis bastante elevados em 2012 - cerca de 86,6 milhões de toneladas (Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO], 2014). No entanto, a sua preservação tem vindo a ser descurada e mesmo atualmente, as ações feitas nesse âmbito continuam a ser insuficientes, ainda que tenham vindo a aumentar. O agravamento da degradação dos ecossistemas marinhos é demonstrado pelo aumento progressivo de *case reports* sobre doenças e mortalidade em massa de mamíferos marinhos, os quais são considerados animais sentinelas (Gulland & Hall, 2007).

Devido à sua enorme vastidão e complexidade, o estudo dos oceanos e dos seus ecossistemas num todo revela-se uma tarefa complicada. Gulland & Hall (2007) afirmam que para poder ser feita uma avaliação correta dos ecossistemas marinhos é necessário que se façam programas de monitorização mais diretos, específicos e de confiança, algo que só pode ser atingido quando já existe uma quantidade considerável de conhecimento sobre o tema. É com esse objetivo que surge este trabalho, no sentido de contribuir para aumentar o conhecimento sobre os ecossistemas marinhos, mais concretamente dos mamíferos marinhos enquanto animais sentinelas.

2.1. Sentinelas

Segundo Stewart et al (2008), espécies e habitats sentinelas têm de pertencer a pelo menos 1 de 3 categorias: (1) tendência a acumular agentes patogénicos, tóxicos ou contaminantes do meio envolvente; (2) ter uma dieta ou fisiologia que possa ser comparável à dos humanos, demonstrando potenciais efeitos prejudiciais para a saúde destes; (3) habitats que englobem pontos-chave do ecossistema, sendo os primeiros e os mais frequentemente afetados por alterações.

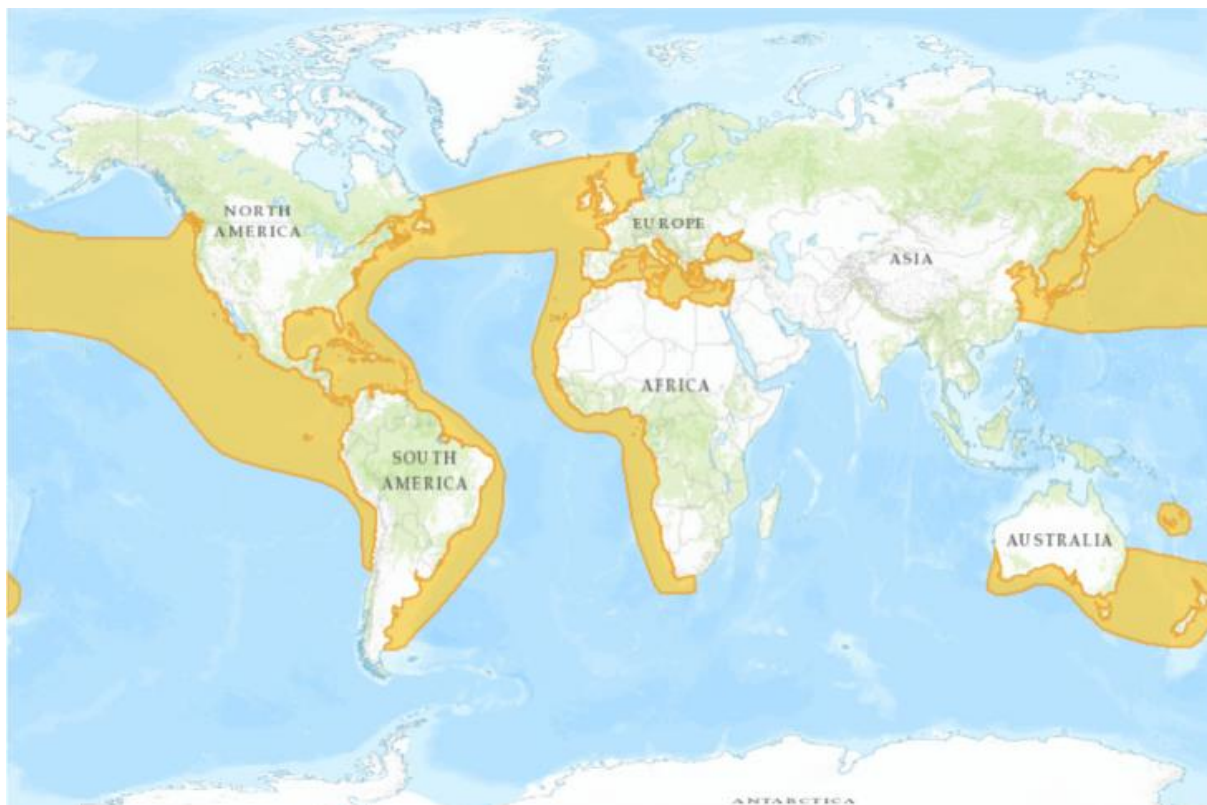
Desta forma, os cetáceos conseguem inserir-se nas duas primeiras categorias, pois, ao serem animais carnívoros no topo da cadeia alimentar, vão atuar como bioacumuladores de compostos que sejam passados ao longo da cadeia alimentar. Este efeito é auxiliado pelo facto de serem animais com grande longevidade e grandes depósitos de gordura (Bossart, 2011); e ao serem mamíferos do meio marinho, partilham a fisiologia e hábitos alimentares mais próximos dos humanos. Estas características aliadas ao facto de serem espécies “carismáticas”, que suscitam grande interesse publico, fazem dos cetáceos boas espécies sentinelas com grande impacto em questões ambientais (Reddy, Dierauf, & Gulland, 2001). No entanto, para que estes possam ser efetivos, é necessário implementar um sistema de vigilância e este tem de ser simples, sensível, representativo e precoce.

2.2. Ecologia dos cetáceos

Os golfinhos comuns (*Delphinus delphi*) pertencem à ordem Cetartiodactyla, classe Mammalia, família Delphinidae (Hammond, et al., 2008). São animais com ampla distribuição mundial (Figura 1), com uma população muito abundante, de cerca de 63,400 indivíduos estimados na costa continental do oceano Atlântico em 2005 (Hammond, et al., 2008). São animais difíceis de estudar devido ao seu estilo de vida migratório em habitat aquático, muitas vezes pelágico, de grande longevidade e com um longo período de gestação (Gulland & Hall, 2007). O seu estatuto de espécie protegida (Decreto-Lei nº 263/81 de 3 de Setembro) impossibilita a captura para recolha de amostras. Posto isto, a única forma para estudar a anatomofisiologia destes animais é através das carcaças de animais mortos arrojados ou de capturas acidentais.

Como já referido, o número de casos reportados de doenças e de arrojamentos em mamíferos marinhos tem vindo a aumentar nos últimos 40 anos (Gulland & Hall, 2007). Isto pode dever-se tanto ao aumento real do número de ocorrências, como à existência de melhores técnicas de identificação dos agentes patogénicos e de melhor organização por parte dos sistemas de vigilância. Seja como for, estes acontecimentos não podem passar despercebidos e é imperativo que se implementem sistemas de vigilância eficazes.

Figura 1 - Distribuição geográfica da população mundial de *Delphinus delphis*



Legenda: Distribuição dos habitats dos golfinhos comuns: área assinalada a amarelo torrado.

Fonte: Hammond, P., Bearzi, G., Bjørge, A., Forney, K., Karczmarski, L., Kasuya, T., et al. (2008). *Delphinus delphis*. Obtido em 3 de Setembro de 2015, de The IUCN Red List of Threatened Species: <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T6336A12649851.en>

2.3. Sistemas de vigilância

Em Portugal os sistemas de vigilância têm vindo a sofrer alterações nos últimos anos. Em 2005 a comissão europeia iniciou um processo de infração contra Portugal (juntamente com outros estados membros) devido à sua insuficiente capacidade de vigilância e proteção dos cetáceos da sua costa (Comissão Europeia, 2005), não respeitando a Directiva Habitats. Desde então têm sido feitos esforços visando a sua otimização. Em 2006 foi realizado um conselho de ministros onde foi criada a Estrutura de Missão para os Assuntos do Mar (EMAM) tendo em vista o desenvolvimento da Estratégia Nacional para o Mar (ENM) (Resolução do Conselho de Ministros nº 163/2006). No âmbito da ENM estabelecida em 2006 foi criada a Comissão Interministerial para os Assuntos do Mar (CIAM) que aprovou o plano para a integração do sistema M@rbis na Rede Natura 2000. O M@rBis é “um sistema de informação georreferenciado da biodiversidade marinha” (M@RBIS - Sistema de Informação para a Biodiversidade Marinha, 2015). Atualmente encontra-se em vigor a ENM implementada em 2013 e aprovada em 2014 (Resolução do Conselho de Ministros nº 12/2014), tendo como objetivo melhorar a vigilância e o aproveitamento dos ecossistemas marinhos até 2020. Dentro da ENM, temos, entre outros planos, o de extensão da Rede Natura 2000 ao ambiente marinho e o Plano Mar Portugal (PMP) que visava implementar a

Directiva Quadro Estratégia Marinha (DQEM) (Anexo B - O Plano Mar-Portugal, 2013-2020), a qual foi implementada em 2014. A DQEM é a parte responsável pela preservação e vigilância dos ecossistemas marinhos,

(...)A DQEM tem como objetivos a proteção, preservação e valorização do ambiente marinho, impedindo a sua deterioração e garantindo, sempre que possível, a sua restauração, bem como a prevenção e progressiva redução da poluição marinha, de modo a assegurar que não existam riscos significativos para a biodiversidade marinha, para os ecossistemas marinhos, para a saúde humana e para as utilizações legítimas do mar (Programa de Monitorização e Programa de Medidas da Diretiva Quadro Estratégia Marinha, 2014, p. 9).

A Rede natura 2000 é uma rede de áreas protegidas da UE, desenvolvida ao abrigo da Directiva Aves e Directiva Habitats, tendo como finalidade assegurar a conservação de espécies e habitats naturais ameaçados da Europa (European Commission, 2015).

Com o objetivo de fornecer dados para a melhor implementação da Directiva Habitats e Directiva Aves em Portugal, foi criado o projeto MarPro, financiado pelo programa LIFE da UE. (LIFE+MarPro, 2013)

O Instituto de Conservação da Natureza e Florestas (ICNF) é o principal órgão envolvido na vigilância da vida selvagem em Portugal (Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas [ICNF], 2015), coordenando várias entidades, como a Rede de Apoio a Mamíferos Marinhos (ABRIGOS). A rede ABRIGOS é a entidade responsável pela coordenação da resolução dos arrojamentos em Portugal (Sociedade Portuguesa de Vida Selvagem [SPVS], 2015). Quando se tratam de animais mortos, a recolha e necropsia são efetuadas pelas autoridades locais, sendo as amostras recolhidas para análise pela SPVS. O mesmo se passa para as capturas acidentais. Estes acontecimentos são relatados, à comissão baleeira internacional (CBI), da qual Portugal faz parte desde 2002 (International Whaling Commission [IWC], 2015) e ao ICNF.

2.4. Imunologia

O sistema imunitário (SI) compreende um conjunto de órgãos, células e moléculas integrados, atuando como um sistema de defesa contra agressões externas.

De um modo geral, o funcionamento básico do SI dos golfinhos é semelhante ao dos humanos e animais domésticos, com algumas possíveis alterações relacionadas com o seu habitat e modo de vida aquático. Segundo Inoue et al (1999), o SI dos golfinhos é mais semelhante ao dos bovinos do que ao dos outros animais domésticos e do homem.

2.4.1. Caracterização geral do Sistema Imunitário

O SI dos golfinhos, tal como nos mamíferos terrestres, pode desenvolver dois tipos de resposta: Inata e adaptativa (adquirida) (King, Aldridge, Kennedy-Stoskopf, & Stott, 2001). A resposta inata é a resposta inespecífica primária e as células que nela intervêm nesta resposta mantêm um número relativamente constante, não apresentando qualquer tipo de memória. As células envolvidas são principalmente os neutrófilos; células sentinela como macrófagos, células dendríticas (DC) e mastócitos; e células *Natural Killer* (NK). É a primeira resposta a ser montada em caso de infeção, estabelecendo um processo local denominado “inflamação”. A inflamação é caracterizada pelo aumento do fluxo sanguíneo no local da lesão/infeção, derivado da libertação de moléculas vasoativas pelos Mastócitos e tecidos lesionados, que levam à vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular local. Ocorrem alteração na aderência vascular levando à adesão local das primeiras células de defesa: neutrófilos e macrófagos, que estabelecem a primeira linha de defesa para o controle da maioria dos agentes patogénicos da área inflamada. Tanto os neutrófilos, como os macrófagos destroem os agentes patogénicos através da fagocitose: interiorização do agente e posterior digestão enzimática. Porém, para que este fenómeno seja possível, é necessário contrariar a carga negativa das bactérias, opsonizando-as com moléculas de carga positiva, denominadas opsoninas. As opsoninas podem ser anticorpos da imunidade adquirida ou moléculas antimicrobianas da imunidade inata, como lectinas e componentes do sistema complemento. O sistema complemento é um conjunto de proteínas séricas e membranares com funções inflamatórias, protetoras e imunorreguladoras, que têm relevância na imunidade inata e adquirida, podendo, não só opsonizar os agentes patogénicos, como também destruí-los diretamente. Muitos dos componentes do sistema complemento, juntamente com outras proteínas, são produzidos nos hepatócitos em resposta às citocinas inflamatórias, formando o grupo das proteínas de fase aguda. Para além das funções do sistema complemento, as proteínas de fase aguda vão ter outras funções importantes na defesa contra agentes patogénicos e na recuperação da inflamação. (Tizard, 2009).

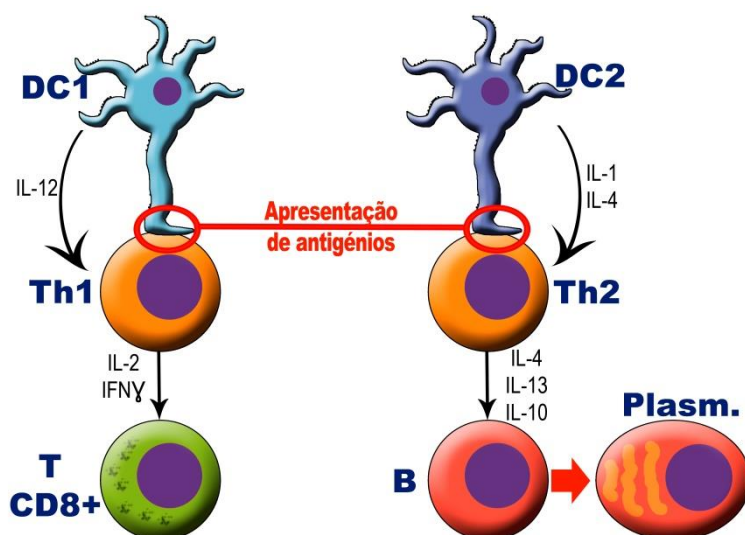
A resposta adaptativa actua inicialmente em situações onde a resposta inata não é suficiente. Trata-se de uma resposta mais específica, com o desenvolvimento de células de memória. Nela participam também algumas células da resposta inata com a função de apresentadores de antígenos: macrófagos e DC. Antígenos são fragmentos do agente patogénico, após processamento pelas células apresentadoras de antígenos (APC), com capacidade de desencadear uma resposta específica. Os antígenos são apresentados aos linfócitos T auxiliares (Th) e estes vão ser as principais células a definir qual a resposta a desencadear. No entanto, a sua ativação também vai estar dependente de quais as células

que apresentaram os antígenos e estas, por sua vez, vão estar dependentes do tipo de antígenos (Figura 2).

A resposta adaptativa a desencadear pode ser de dois tipos: humoral e celular. Na resposta humoral, as principais células intervenientes são os linfócitos B, que se podem diferenciar em plasmócitos com capacidade de produção de anticorpos; ou em células B de memória. Na resposta celular, as principais células intervenientes são os linfócitos T citotóxicos (CD8+) e células NK, estando estas também envolvidas na imunidade inata. Existe ainda outra classe importante de linfócitos T: os linfócitos T reguladores, cuja função é regular a resposta adaptativa, de modo a que não se desenvolva na ausência de estímulo antígeno e impedindo a sua perpetuação (Tizard, 2009).

As respostas inata e adaptativa encontram-se intimamente relacionadas entre si através da produção de citocinas pelas diferentes células envolvidas. Estas proteínas têm uma ação de sinalização intracelular, direcionando a ação das células do SI.

Figura 2 - Esquema geral da sinalização da resposta adaptativa



Legenda: DC- Célula dendrítica tipo 1 (mieloides); DC2 – Célula dendrítica tipo 2 (plasmocitoides); Th1 – Linfócito T auxiliar tipo 1; Th2 – Linfócito T auxiliar tipo 2; TCD8+ – Linfócito T citotóxico; B – Linfócito B; Plasm. – Plasmócito

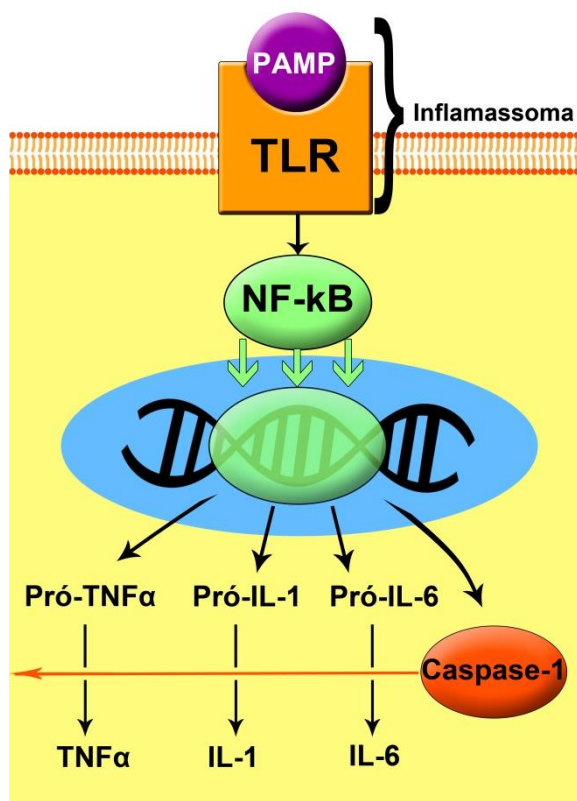
2.4.2. Citoquinas

As citocinas são proteínas solúveis produzidas pelas diferentes células do SI, atuando como sinalizadores intercelulares, permitindo a comunicação e a integração entre as diferentes respostas do SI. Ao contrário das hormonas convencionais, cada citocina pode ser produzida por diferentes células, assim como pode agir sobre diferentes células do SI, por vezes numa forma redundante. Para além das funções reguladoras que exercem sobre a resposta imunitária, as citocinas estão envolvidas noutros processos, dos quais se destacam a fibrinogénese, a lipólise (Tizard, 2009) e a função cardíaca (Ridker, et al., 2000) entre outras. Dada esta diversidade e falta de linearidade de funções, existem diferentes formas de as classificar.

2.4.2.1. Processos que antecedem a produção de citocinas

Os Padrões moleculares associados a agentes patogénicos (PAMP) são moléculas altamente conservadas presentes nos agentes infecciosos, tais como alguns compostos da sua periferia, ausentes nas células animais. As células sentinelas como as células dendríticas, alguns macrófagos e mastócitos, reconhecem os agentes patogénicos através da ligação dos PAMPs a recetores celulares capazes de identificar padrões moleculares, tais como os recetores tipo Toll (TLR) e os tipo NOD (NLR), entre outros. Os TLR localizam-se principalmente na membrana citoplasmática na superfície das células, enquanto os NLR se encontram no interior da célula. Quando um PAMP se liga a um TLR, forma o inflamassoma e são ativadas diferentes vias de sinalização. Uma delas é um fator ativador da transcrição celular, denominado Fator Nuclear kappa-B (NF- κ B), cuja função é a ativação da transcrição dos genes codificantes das citocinas pró-inflamatórias, nomeadamente a Interleucina-1 (IL1); Interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF α). Simultaneamente, esse inflamassoma vai ativar a produção da Caspase-1, uma enzima que vai ser responsável pela ativação de polipéptidos precursores de algumas interleucinas, que se encontram no citoplasma, enquanto pró-moléculas inativas após a sua tradução (Figura 3). Os NLR também vão atuar na geração de NF- κ B (Tizard, 2009).

Figura 3 - Sinalização PAMP-TLR



Legenda: NF- κ B – Fator de transcrição nuclear κ B; PAMP – Padrão molecular associado a agentes patogénicos; TLR – recetor tipo toll.

Através do processamento inicial dos PAMP, as APC, particularmente as DC, vão ser responsáveis pela ativação dos linfócitos Th. Para tal, é necessário que as APC expressem o antígeno ligado aos seus complexos maiores de histocompatibilidade classe 2 (MHC classe II) na superfície celular. Desta forma, os MHC classe II vão ser reconhecidos por receptores CD4, permitindo que ocorra uma interação mais prolongada entre as duas células. Os receptores CD4 estão associados aos receptores de antígenos dos linfócitos T (TCR), específicos para aquele antígeno e, em conjunto, vão ativar o complexo proteico CD3. Este complexo proteico garante a transdução do sinal para o interior da célula, levando à ativação de tirosina quinases (TK) cuja ação enzimática ativa três fatores de transcrição principais: i) o fator nuclear de linfócitos T ativados (NF-AT), ii) o NF- κ B e a iii) proteína ativadora 1. No entanto, para que a ativação da célula seja efetiva, são necessários três fatores co-estimuladores (Figura 4):

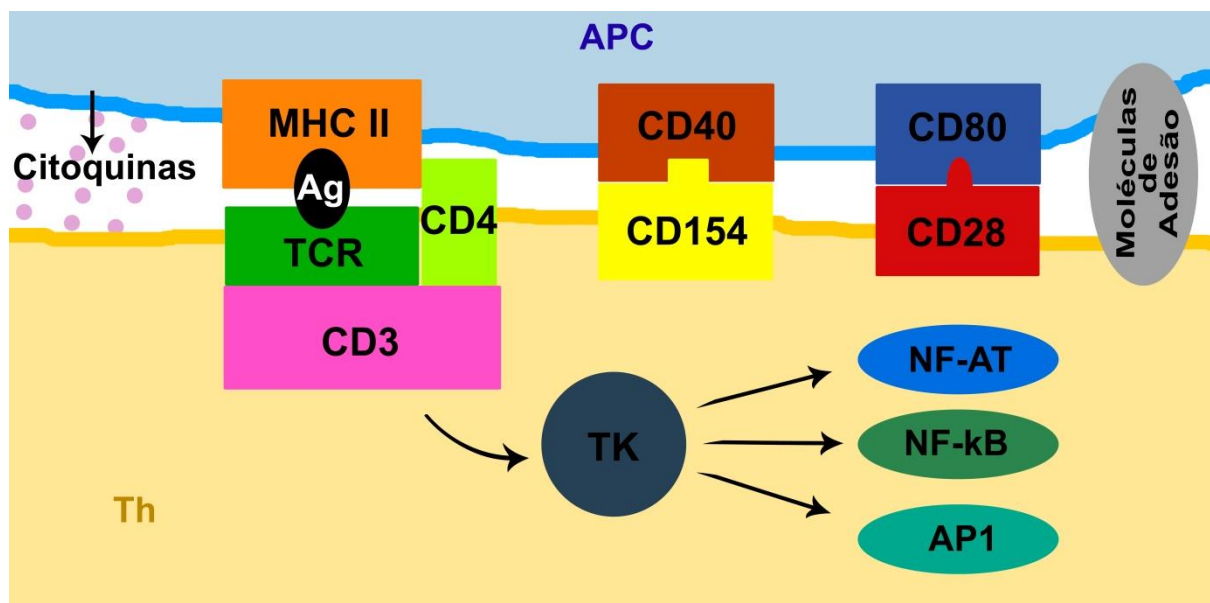
1. Ligação de receptores secundários entre as APC (CD40) e os Linfócitos T (CD154) e entre os linfócitos T (CD28) e as APC (CD80) ou com os linfócitos B (CD86);
2. Moléculas de adesão, como a ICAM-1, que mantenham as células unidas por mais tempo e
3. Citoquinas libertadas pela APC.

As citoquinas co-estimuladoras vão determinar o tipo de Linfócitos Th que irá ser estimulado. DC1 ou macrófagos ativados pró-inflamatórios (M1) vão produzir IL12 que despoleta uma resposta Th1, com libertação de IL2, IFN γ e TNF α . DC2 vão produzir IL1 e IL-4, estimulando a resposta TH2, com libertação de IL10, IL4, IL5, IL6 e IL13, entre outras (Tizard, 2009).

Todos os processos descritos implicam a ativação de fatores ativadores da transcrição, que desencadeia a transcrição dos mRNA codificantes das diferentes citoquinas e posteriormente à sua tradução, dando origem às moléculas proteicas funcionais. O mRNA celular contém a informação genética ativa em processamento na célula.

A avaliação do padrão de expressão genético das células pode ser efetuada através do estudo da expressão dos genes em relação a um gene constitutivo de expressão constante (gene referência). Considerando que as citoquinas são os mediadores químicos do SI, o estudo das variações da sua expressão genética permite avaliar as pressões imunitárias em curso.

Figura 4 - Sinalização celular APC-Th



Legenda: Ag – Antígeno; AP1 – Proteína ativadora 1; APC – Célula apresentadora de antígenos; CD – Cluster de Diferenciação; MHC II – Complexo maior de histocompatibilidade tipo 2; NF-AT – Factor de transcrição nuclear de linfócitos T ativados; NF-kB – Factor de transcrição nuclear kB; TCR – Receptor das células T; Th – Linfócito T auxiliar; TK – Tirozina Quinase

2.4.2.2. Citoquinas Pro-inflamatórias – TNF- α , IL-1, IL-6

2.4.2.2.1. TNF- α

A caqueta, denominada fator de necrose tumoral alfa ou fator indutor de diferenciação (DIF) e TNFSF2 (Aggarwal, Samanta, & Feldmann, TNF α , 2000) – é uma proteína trimérica com uma massa molecular de aproximadamente 17kDa (Denis & Archambault, 2001). É produzida principalmente por macrófagos e monócitos; células dendríticas; mastócitos; linfócitos T; linfócitos B ativados; células NK; neutrófilos; entre outros (Bonder, Finlay-Jones, & Hart, 1999; Serbina, Salazar-Mather, Biron, Kuziel, & Pamer, 2003; Gordon & Galli, 1990; Huaux, Liu, McGarry, Ullenbruch, & Phan, 2003; Opata, Ye, Hollifield, & Garvy, 2013; Kashii, Giorda, Herberman, Whiteside, & Vujanovic, 1999; Cassatella, Meda, Bonora, Ceska, & Constantin, 1993).

A modulação positiva da sua produção é efetuada por diferentes citocinas potenciadoras de resposta imunitária (como interferões, IL-1 β , IL-2, IL-12) e fatores de ativação celular relacionados com lesão tecidual e inflamação (Vila-del Sol, Punzón, & Fresno, 2008; Bethea, Gillespie, & Benveniste, 1992; Aste-Amezaga, D'Andrea, Kubin, & Trinchieri, 1994; Falvo, et al., 2000; Saraya & Balkwill, 1993). A modulação negativa ocorre por ação de citocinas imunossupressoras (IL-6 e IL-10) e de resposta Th2 (IL-4 e IL-13), para além da ação de agentes e fármacos imunossupressores/anti-inflamatórios e antioxidantes (Aderka, Le, & Vilcek, 1989; Levings & Schrader, 1999; de Waal Malefyt, et al., 1993a; 1991; Debets, Ruers, van der Linden, van der Linden, & Buurman, 1989; Euqui, et al., 1994).

O TNF- α pode ligar-se a dois recetores distintos: o p60 (tipo 1, p55 ou CD120a) e o p80 (tipo 2, p75 ou CD120b). O p60 é expresso por todos os tipos de células sendo responsável pelos efeitos citotóxicos do TNF- α (Aggarwal, Samanta, & Feldmann, TNF Receptors, 2000). O p80 é principalmente expresso por células dos sistemas hematopoético e imunitário e, quando na forma solúvel, é um potente antagonista do TNF- α (Tilg, Trehu, Atkins, Dinarello, & Mier, 1994; Aggarwal, Samanta, & Feldmann, TNF Receptors, 2000).

O TNF- α é constituído por uma sequência amino-acídica altamente conservada entre espécies (Denis & Archambault, 2001). O TNF- α é inicialmente traduzido como uma proteína precursora, que é clivada intracelularmente pela enzima Caspase 1, dando origem à sua forma ativa (Tizard, 2009). A clivagem enzimática pode ocorrer fora da célula pela enzima proteinase 3, dando origem também a uma molécula ativa (Coeshott, et al., 1999).

A sua função na defesa do organismo é essencial, sendo dos principais intervenientes no fenómeno da inflamação. É a primeira citocina pró-inflamatória a ser produzida num processo inflamatório, sendo seguida pela IL1 e posteriormente pela IL6 (Tizard, 2009). Os seus efeitos pró-inflamatórios incluem: a quimiotaxia de monócitos e neutrófilos e a facilitação da fagocitose, a adesão desses leucócitos a células endoteliais e a estimulação do burst oxidativo (Wang, Walter, & Mantovani, 1990; Smart & Casale, 1994; Collins & Bancroft, 1992; Mackay, Loetscher, Stueber, Gehr, & Lesslauer, 1993; Itou, et al., 2002). É responsável pelos “sinais cardeais” da inflamação: calor, tumor, edema, dor e rubor (Tizard, 2009). Isto deve-se à participação do TNF- α no aumento da permeabilidade vascular através da estimulação do fator de permeabilidade vascular VEGF e de outras citocinas pró-inflamatórias (IL-8, IL-1, GM-CSF), assim como das enzimas ciclo-oxigenase 2 (COX-2) e NOS2, que vão promover e prolongar a inflamação (Giraud, et al., 1998; Smart & Casale, 1994; Munker, Gasson, Ogawa, & Koeffler, 1986; Nakao, et al., 2002; Barsacchi, et al., 2003; Bachwich, Chensue, Larrick, & Kunkel, 1986). Vai também estimular a chamada e adesão de leucócitos ao local de inflamação através da estimulação da produção de quimiocinas e moléculas de adesão (McHale, Harari, Marshall, & Haskard, 1999; Murao, et al., 2000; Zhao, Chen, Yao, & Chen, 2005). Vai associar-se à IL-1 para atuar no cérebro, causando febre, letargia, mal-estar e falta de apetite (Bluthé, Dantzer, & Kelley, 1991; Stefferl, Hopkins, Rothwell, & Luheshi, 1996; Tizard, 2009). Em casos extremos de infeções muito graves por bactérias gram-negativas, que resultem em sépsis, o TNF- α é o principal mediador da síndrome do choque séptico, provocado pela libertação do LPS da parede bacteriana (Spooner, Markowitz, & Saravolatz, 1992).

Tem também alguma capacidade de induzir a produção de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos (Fonfara, Kakuschke, Rosenberger, Siebert, & Prange, 2008; Baumann & Gauldie, 1990).

Para além da sua importância na imunidade inata, participa na transição para imunidade adquirida, principalmente na celular, participando na apresentação de antígenos pelas APC

e na co-estimulação e sensibilização dos linfócitos T a citocinas da resposta celular (Tizard, 2009; Lowenthal, Ballard, Böhnelein, & Greene, 1989; Sallusto & Lanzavecchia, 1994). Tem atividade antitumoral (Urban, Shepard, Rothstein, Sugarman, & Schreiber, 1986).

2.4.2.2.2. IL-1

A Interleucina 1 – originalmente referida como EP, LEM, MCF ou LAF (Dinarello, 2000) – é uma citocina pro-inflamatória de cerca de 17kDa (Denis & Archambault, 2001).

É produzida principalmente pelos monócitos, macrófagos e células dendríticas e secundariamente por linfócitos T, B neoplásicos, células NK e queratinócitos ativados (Puren, Fantuzzi, & Dinarello, 1999; Gardella, et al., 2000; Numerof, Kotik, Dinarello, & Mier, 1990; Aguilar-Santelises, et al., 1991; Zepter, et al., 1997; Conti, et al., 1991).

A sua produção e libertação são processos complexos que necessitam diferentes estímulos: A transcrição do mRNA codificante é estimulada pelo sistema complemento (Schindler, Gelfand, & Dinarello, 1990b), pela hipoxia (Ghezzi, et al., 1991), pela coagulação (Mileno, et al., 1995) e pela IL-2 (Saraya & Balkwill, 1993). No entanto, para ocorrer transcrição e tradução, é necessária a estimulação pela ligação de PAMPs a recetores TLR e CD14 (Tizard, 2009) ou pelo contacto da IL-1 com os recetores celulares (Schindler, Gelfand, & Dinarello, 1990b).

Quando a IL-1 é traduzida, apresenta duas formas: a forma ligada à célula, denominada IL-1 α e a forma livre, denominada IL-1 β (Dinarello, 2000). Ambas as proteínas têm efeitos semelhantes, partilhando sequências amino-acídicas comuns nas regiões de ligação aos recetores (Beineke, Siebert, Wohlsein, & Baumgärtner, 2010).

A IL-1 β é inicialmente traduzida como uma proteína precursora com cerca de 31kDa, sendo posteriormente clivada intracelularmente pela enzima Caspase 1, dando origem à sua forma ativa com um peso molecular de 17,4 kDa (Black, et al., 1988; Tizard, 2009). A clivagem enzimática pode ocorrer fora da célula pela enzima proteinase 3, dando origem também a uma molécula ativa (Coeshott, et al., 1999).

A IL-1 β vai ligar-se aos recetores IL-1R tipo 1 (CD121a) e IL-1R tipo 2 (CD121b): O IL-1R1 é o recetor de sinalização após interação com uma proteína acessória denominada IL-1RAcP; o IL-1R2 é um inibidor, ligando-se irreversivelmente à citocina, funcionando como antagonista (Dinarello, 2000; Tizard, 2009).

Para além do IL-1R tipo 2, que é o principal antagonista e inibidor dos efeitos desta citocina (Granowitz, et al., 1991), existem outros antagonistas, inibidores da sua produção, dos quais o IFN γ , IFN α , IL-10, IL-13, IL-4, IL-6, corticosteroides e antioxidantes são exemplos (Schindler, Ghezzi, & Dinarello, 1990a; de Waal Malefyt R., Abrams, Bennett, Figdor, & de Vries, 1991; de Waal Malefyt, et al., 1993a; Vannier, Miller, & Dinarello, 1992; Schindler, et al., 1990c; Uehara, Kohda, Sekiya, Takasugi, & Namiki, 1989; Euqui, et al., 1994). A IL-1 β é

uma proteína cuja sequência aminoacídica é conservada de espécie para espécie (Beineke, Siebert, Wohlsein, & Baumgärtner, 2010).

Aliada ao TNF α , atuam no cérebro sendo responsáveis pela febre, letargia, mal-estar e falta de apetite (Bluthé, Dantzer, & Kelley, 1991; Stefferl, Hopkins, Rothwell, & Luheshi, 1996; Tizard, 2009). Estimula também a síntese de COX-2 e NOS2 pelos macrófagos, promovendo a inflamação local (Sato, et al., 2012). Nas células do endotélio vascular, a IL-1 β estimula a liberação de quimiocinas e moléculas de adesão para atrair leucócitos circulantes (McHale, Harari, Marshall, & Haskard, 1999; Parry, Martin, Felts, & Cobb, 1998; Kaplanski, et al., 1994). Promove ainda a coagulação (Yang, et al., 2013).

A IL-1 estimula o nervo vago e o SNC, tornando-os mais suscetíveis a estímulos (Ek, Kurosawa, Lundeberg, & Ericsson, 1998; Samad, et al., 2001). Estimula a proliferação e a ativação de fibroblastos, queratinócitos, células mesangiais, células da glia e da musculatura lisa vascular (Postlethwaite, Lachman, & Kang, 1984; Elias, Freundlich, Adams, & Rosenbloom, 1990; Yano, Banno, Walsh, & Blumenberg, 2008; Tesch, Lan, Atkins, & Nikolic-Paterson, 1997; Spangelo, Farrimond, Pompilius, & Bowman, 2000; Libby, Warner, & Friedman, 1988). Suspeita-se que também intervenha na reabsorção óssea pelos osteoclastos (Jimi, et al., 1999). Uma das suas principais funções, aliada à IL-6, é a indução das células hepáticas (e alguns macrófagos e linfócitos) a produzirem as proteínas de fase aguda tipo 1, tais como a haptoglobina (HP), a proteína do choque térmico 70 (HSP70 do inglês heat shock protein) e a metalotioneína 2 (MT2) (Fonfara, Kakuschke, Rosenberger, Siebert, & Prange, 2008; Tizard, 2009; Cray, Zaias, & Altman, 2009). Tem alguma importância na transição para a resposta humoral (Tizard, 2009; Farrar & Hlilfiker, 1982).

2.4.2.2.3. IL-6

A IL6 – também conhecida como IFN- β 2; TRF; BCDF; BCDFII; proteína 26kDa; BSF-2, HPGF; HSF ou MGI-2 (Matsuda & Hirano, IL-6, 2000) – é uma proteína composta por 186 aminoácidos, que se apresenta com 5 formas diferentes, cuja massa molecular varia entre 21 a 30kDa. É produzida primariamente como uma proteína precursora de 212 aminoácidos, que, após glicosilação e fosforilação, dá origem às formas ativas (May, et al., 1988). É produzida principalmente por macrófagos, mastócitos (Tizard, 2009; Feder, Todaro, & Laskin, 1993; Burd, et al., 1989), fibroblastos (Van Damme, et al., 1989) e células endoteliais (Feder, Todaro, & Laskin, 1993) e secundariamente por linfócitos T (Espevik, Waage, Faxvaag, & Shalaby, 1990) e B (Tanaka, et al., 1988); eosinófilos (Hamid, et al., 1992), mastócitos (Burd, et al., 1989), condrócitos (Guerne, Carson, & Lotz, 1990), osteoblastos (Ishimi, et al., 1990), células da micróglia, astrócitos (Yasukawa, et al., 1987), trofoblastos (Kameda, et al., 1990), queratinócitos (Grossman, et al., 1989), células da musculatura lisa (Loppnow & Libby, 1990), células mesangiais (Ruef, et al., 1990), células beta e células da tireoide (Bendtzen, Buschard, Diamant, Horn, & Svenson, 1989), entre possíveis outras. A

sua produção é induzida por PAMPs e estimulação antigénica; pelas citocinas pró-inflamatórias IL1 e TNF α , assim como pelo IFN β , pelo PDGF e pela IL-2 (Tizard, 2009; Kohase, May, Tamm, Vilcek, & Sehgal, 1987; Saraya & Balkwill, 1993). É inibida nos leucócitos por glucocorticoides e pelas citocinas Th2: IL-4 e IL-13 (Waage, Slupphaug, & Shalaby, 1990; te Velde, Huijbens, Heije, de Vries, & Figdor, 1990; Minty, et al., 1993). A IL-6 pode também ser estimulada pela IL-4, quando da resposta humoral, sendo libertada por Linfócitos B; e pela il-13 nos osteoblastos (Smeland, Blomhoff, Funderud, Shalaby, & Espevik, 1989; Frost, et al., 1998).

Os recetores da IL-6 consistem em duas subunidades proteicas: a IL-6R (cadeia alfa), que se liga à IL-6 com baixa afinidade e a gp130 (cadeia beta), uma glicoproteína transmembranar que se liga ao complexo formado pela IL-6 e a IL-6R, formando um novo complexo de alta afinidade capaz de induzir a sinalização celular (Ward, et al., 1994).

A IL-6 intervém tanto na imunidade inata como na adquirida. Na primeira, apesar de estar associada às citocinas pró-inflamatórias IL-1 e TNF α , os seus efeitos são moduladores, com características anti-inflamatórias, servindo como feedback negativo à produção da IL-1 e TNF α e aumentando a produção dos seus antagonistas (Schindler, et al., 1990c; Tilg, Trehu, Atkins, Dinarello, & Mier, 1994). Em conjunto com o IFN γ , reduz a neutrofilia nos tecidos e estimula a produção de outras moléculas anti-inflamatórias (Tilg, Trehu, Atkins, Dinarello, & Mier, 1994; Tizard, 2009). Contraditoriamente inibe os efeitos supressores dos linfócitos T reguladores e tem também efeitos estimuladores da inflamação neutrofílica, pois é um dos principais indutores dos linfócitos Th17 (Fujimoto, et al., 2008). É o principal responsável pela resposta de fase aguda (Tizard, 2009), estando implicada na ativação dos hepatócitos para produzirem proteínas como o fibrinogénio, hemopexina, haptoglobina, proteína amilóide A, proteína C reactiva (CRP) e inibidores de proteases (Gauldie, Richards, Harnish, Lansdorp, & Baumann, 1987; Castell, et al., 1988). Para além de regular a inflamação, a IL-6 é também um dos principais mediadores do choque séptico (Tizard, 2009). Atua no cérebro e estimula a febre e a libertação de hormonas adrenocorticotrofinas pelo hipotálamo (Ruzek, Miller, Opal, Pearce, & Biron, 1997) e de prolactina, hormona de crescimento e hormona luteinizante pela hipófise (Spangelo, Judd, Isakson, & Macleod, 1989). É também uma citocina importante na transição da resposta dominada por neutrófilos no início da inflamação, para uma dominada por macrófagos e posteriormente na transição da imunidade inata para a adquirida (Tizard, 2009). Na primeira tem importantes funções na hematopoiese, sendo um indutor importante do início do ciclo das células progenitoras (Ogawa, 1993); na maturação e quimiotaxia de macrófagos (Mitani, et al., 2000; Biswas, et al., 1998) e na maturação de megacariócitos aliada à IL-3 (Ishibashi, et al., 1989).

Na imunidade adquirida intervém na maturação dos linfócitos B em plasmócitos, embora não seja essencial para a ocorrência destes fenómenos (Funke, King, McBain, Adelung, & Stott,

2003). Está também envolvida na ativação, crescimento e diferenciação dos linfócitos T, aliada à IL-2 (Matsuda & Hirano, 1990). É o primeiro promotor de maturação dos linfócitos Th2, sendo a sua função completada pela IL-4 (Kidd, 2003; Rincón, Anguita, Nakamura, Fikrig, & Flavell, 1997). No fígado é essencial em processos de regeneração hepática, sendo dos principais ativadores da proliferação do parênquima (Michalopoulos & DeFrances, 1997). Nos ossos participa, com outros sinalizadores celulares, na indução da formação de osteoclastos e absorção óssea (Ishimi, et al., 1990).

2.4.2.3. Citoquinas da resposta Celular – IL12, IL2 e IFN- γ (TNF- α)

2.4.2.3.1. IL-12

A Interleucina-12 – também conhecida com TCMF; TSF; NKSF e CLMF (Esche, Shurin, & Lotze, 2000) é uma proteína heterodimérica de 70kDa, composta por duas subunidades: p35 e p40, localizadas em exões diferentes (Sieburth, et al., 1992). Após tradução, as duas subunidades são unidas por pontes dissulfato e glicosilação (Esche, Shurin, & Lotze, 2000). A subunidade p40 é a principal responsável pelos seus efeitos e é produzida apenas por células secretoras de IL-12, enquanto a p35 é expressa por todas as células (Ma, et al., 1996). Todas as células que produzem a IL-12 biologicamente ativa produzem simultaneamente grandes quantidades de p40, que não é biologicamente ativa (Schoenhaut, et al., 1992). A IL-12 é principalmente produzida por APC e de atividade fagocítica – como células dendríticas (Grohmann, et al., 1998), células de Langerhans (Kang, et al., 1996), monócitos e macrófagos (D'Andrea, et al., 1992) – na fase inicial duma resposta mediada por células. É também produzida em pequenas quantidades por queratinócitos (Muller, et al., 1994), neutrófilos (Cassatella, et al., 1995), mastócitos (Smith, Ducharme, & Weis, 1994) e linfócitos B (D'Andrea, et al., 1992). A produção de IL-12 é potenciada pela interação das APC com linfócitos T, através das suas moléculas co-estimuladoras, como o CD40, CD80 e CD58 (Esche, Shurin, & Lotze, 2000). O IFN γ tem a capacidade de aumentar a expressão dos recetores CD40 nas células mononucleares, facilitando esta interação (Alderson, et al., 1993). Para além disto, o IFN γ aumenta o efeito do LPS na indução da transcrição da IL-12 (Hayes, Wang, & Norcross, 1995). Existem também outras citoquinas estimuladoras da produção de IL-12, como o TNF- α e o GM-CSF, assim como outros antígenos bacterianos, protozoários e vírus (Esche, Shurin, & Lotze, 2000).

A IL-12 tem como inibidores, a IL-10, que impede a existência dum feedback positivo contínuo entre a IL-12 e o IFN γ (D'Andrea, et al., 1993); as citoquinas Th2 (IL4; IL13) (D'Andrea, Ma, Aste-Amezaga, Paganin, & Trinchieri, 1995); a prostaglandina E2 (PGE2) (van der Pouw Kraan, Boeijie, Smeenk, Wijdenes, & Aarden, 1995) e a histamina (van der Pouw Kraan, et al., 1998); a 1,25 dihidrovitamina D3, que inibe a libertação da IL-12 produzida por monócitos (D'Ambrosio, et al., 1998); o Óxido Nítrico (NO) (Mukhopadhyay,

George, Bal, Ravindran, & Rath, 1999); TGF- β (D'Andrea, Ma, Aste-Amezaga, Paganin, & Trinchieri, 1995); hormonas do *stress* como corticosteroides e catecolaminas (Elenkov, Papanicolaou, Wilder, & Chrousos, 1996); neuropeptídeos como o péptido vasoativo intestinal (VIP) e a PACAP (Delgado & Ganea, 1999); e a MCP-1 (Chensue, et al., 1996), entre outros. Como antagonista principal, a IL-12 tem a própria p40, que se liga aos recetores sem exercer efeito, servindo como antagonista competitivo (Mattner, et al., 1993).

O recetor da IL12, o IL-12R, é composto por duas subunidades: a IL-12R β 1, à qual se liga a p40 e a IL-12 β 2, à qual se liga a p35 (Presky, et al., 1996).

A IL-12 é essencial para a defesa do organismo contra agentes patogénicos intracelulares, estimulando a resposta Th1 e induzindo a produção de IFN γ em níveis suficientes por parte de linfócitos T e células NK, sinergicamente com a IL-2 (Chan, et al., 1991; Manetti, et al., 1993). No entanto, para se dar essa diferenciação e a produção de IFN γ , é também necessária a presença de citocinas pro-inflamatórias como o TNF- α , a IL-1 (D'Andrea, et al., 1993). Na ausência de IL-12, a resposta passa de Th1 para Th2, devido à IL-4 (Tizard, 2009). Para além do IFN γ , estimula também a produção de pequenas quantidades de TNF α , GM-CSF, M-CSF (Aste-Amezaga, D'Andrea, Kubin, & Trinchieri, 1994), IL2 (Davis, Ramos, Matthews, & Farrar, 2008), IL-10 (Morris, et al., 1994) e de algumas quimiocinas, como a IL-8 (Ethuin, et al., 2001), tendo algumas funções pró-inflamatórias (Tizard, 2009). A IL-12 é ainda capaz de estimular a sua própria produção nas células dendríticas, através da estimulação do NF-kB (Grohmann, et al., 1998). Como estimulador da imunidade celular, para além da estimulação da produção de IFN γ , a IL-12 tem também a capacidade de estimular a proliferação e diferenciação de linfócitos T e células NK (Kidd, 2003) e, juntamente com a IL-2 induzir a citotoxicidade dos linfócitos T citotóxicos CD8+ (Gately, Wolitzky, Quinn, & Chizzonite, 1992). Nas células NK induz a expressão de moléculas de adesão (Rabinowich, Herbermann, & Whiteside, 1993) e de recetores da IL-2 e tem também algum efeito na sua toxicidade, apesar de menor que o produzido pela IL-2 e independente da IL-4 (Robertson, et al., 1992). Tem algum efeito hematopoiético, estimulando as células progenitoras da medula óssea (Jacobsen, Veiby, & Smeland, 1993). Nos linfócitos B, aumenta a sua sobrevivência e estimula os que ainda não estão ativados (Dubois, et al., 1998) tendo, no entanto, um efeito supressor na síntese de IgE (Morris, et al., 1994). Também é através dos linfócitos B que a IL-12 inicia um processo de feedback negativo à sua própria produção, aumentando a síntese de IL-4 (Skok, Poudrier, & Gray, 1999). Sinergicamente com a IL-18, inibe a angiogénese (Coughlin, et al., 1998). A p40, apesar de não estimular os recetores IL-12R, apresenta algum efeito quimiotático sobre os macrófagos (Ha, et al., 1999).

2.4.2.3.2. IL-2

A IL-2 – originalmente denominada como TCGF – é uma pequena glicoproteína globular com 15,5 kDa, tendo sido a primeira interleucina a ser isolada, purificada e caracterizada a nível molecular (Robb & Smith, 1981).

É produzida principalmente por Th1 CD4+ ativados (Tizard, 2009; Salmon, Kitas, Gaston, & Bacon, 1988); linfócitos B (Lagoo, Tseng, & Sell, 1990) e células dendríticas (Zelante, Fric, Wong, & Ricciardi-Castagnoli, 2012).

A sua produção é aumentada com a ativação de CD28, que ativa mais vias NF- κ B (Verweij, Geerts, & Aarden, 1991; Seder, Germain, Linsley, & Paul, 1994) e estabiliza o mRNA (June, Ledbetter, Gillespie, Lindsten, & Thompson, 1987) e é inibida pela IL-4 e pela ação dos glucocorticoides (Gillis, Crabtree, & Smith, 1979a; 1979b; Tanaka, Hu-Li, Seder, de St. Groth, & Paul, 1993). Os glucocorticoides são libertados por feedback negativo exercido pelas citocinas pro-inflamatórias no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, pelo que estas citocinas, nomeadamente a IL-1, IL-6 e TNF α podem ser considerados inibidores indiretos (Chrousos, 1995).

Tem como recetor o IL-2R, que é expresso continuamente por células NK e de forma transitória pelas células T ativadas (Smith K. A., 2000). Apenas 10% das células NK expressam IL-2R de alta afinidade, as restantes células expressam o IL-2R de afinidade intermédia (Caliguri, et al., 1990).

Funcionalmente, a IL-2 é um dos principais promotores da resposta adquirida celular, ao mesmo tempo que aumenta a resposta inata através das células NK e mantém a comunicação entre as duas respostas. Promove a proliferação e diferenciação de linfócitos Th CD4+, quer sejam Th1 ou Th2 (Seder, Germain, Linsley, & Paul, 1994; Doms, Wolslegel, Lin, & Abbas, 2007); T citotóxicos CD8+ (Cousens, Orange, & Biron, 1995) e células NK (Suzuki, Handa, Itoh, & Kumagai, 1983), tendo a capacidade de estimular a expressão de moléculas de MHC classe II e outras moléculas co-estimuladoras nas APC (Abdel-Salam, 2010). É também responsável pelo tamanho, função e sobrevivência das células T de memória após a resposta primária (Boyman, Cho, & Sprent, 2010; Doms, Wolslegel, Lin, & Abbas, 2007). No entanto, a relevância da IL-2 no desenvolvimento de linfócitos T citotóxicos CD8+ está dependente do tipo de antígeno, principalmente na cronicidade da infeção, podendo ser essencial ou secundária (Bachmann, Wolint, Walton, Schwarz, & Oxenius, 2007). Influencia também a libertação de IFN γ (Cousens, Orange, & Biron, 1995; Handa, Suzuki, Matsui, Shimizu, & Kumagai, 1983; Kasahara, Hooks, Dougherty, & Oppenheim, 1983), TNF α e IL-1 (Saraya & Balkwill, 1993) e estimula a ação citolítica dos linfócitos T e das células NK, através da ativação da transcrição de genes de perforinas (Lehmann, Zeis, & Uharek, 2001; Zhang, Scordi, Smyth, & Lichtenheld, 1999). A IL-2 promove também a expressão dum ligando da Fas nas células alvo dos Linfócitos T citotóxicos. Estes, por sua vez, expressam a Fas, que é uma proteína de superfície

responsável pela promoção da morte celular programada (Esser, et al., 1997). A ação da IL-2 nos linfócitos B não está completamente esclarecida. A IL-2 apresenta alguma capacidade estimuladora da proliferação e diferenciação dos linfócitos B em plasmócitos (Zubler, et al., 1984; Nakagawa, Nakagawa, Goldstein, Volkman, & Fauci, 1986) e está envolvida na libertação de IgM na resposta a antígenos (Punnonen, 1989; Sauerwein, van der Meer, Dräger, & Aarden, 1985). Apesar dos seus efeitos estimuladores, a IL-2 tem também efeitos inibidores nas células onde atua: como já referido, intervém no mecanismo de indução da morte celular mediados pela Fas e pelo seu ligando, seja em células infetadas ou como mecanismo de autorregulação (Kneitz, Herrmann, Yonohara, & Schimpl, 1995; Rafaeleli, Van Parijs, London, Tschopp, & Abbas, 1998) e estimula linfócitos T reguladores (Papiernik, de Moraes, Pontoux, Vasseur, & Pénit, 1998). Estes mecanismos são de extrema importância na manutenção da homeostasia, evitando uma resposta celular exageradamente prolongada, como observado em animais knockout para o gene da IL-2 (Klebb, et al., 1996).

2.4.2.3.3. IFN- γ

O Interferão γ – também referido como Interferão tipo II, Interferão imune e MAF – é uma proteína homodimérica, produzida em grandes quantidades na resposta celular, participando também na hipersensibilidade tardia (tipo 4) e na inflamação da resposta inata (Tizard, 2009; Billiau & Vandenbroeck, 2000).

É produzido maioritariamente por linfócitos T ativados, principalmente Th1 CD4+ e CD8+ e células NK ativadas (Handa, Suzuki, Matsui, Shimizu, & Kumagai, 1983; Kasahara, Hooks, Dougherty, & Oppenheim, 1983; Fong & Mosmann, 1990). É também produzido esporadicamente por macrófagos, neutrófilos e neurónios (Fultz, Barber, Dieffenbach, & Vogel, 1993; Yeaman, et al., 1998; Neumann, Schmidt, Wilharm, Behrens, & Wekerle, 1997). A sua produção encontra-se centrada em tecidos inflamados e principalmente nos linfonodos periféricos dessa região, após a migração dos linfócitos T ativados para essa zona (Kidd, 2003; Billiau & Vandenbroeck, 2000).

Caso não sejam estimuladas, tanto os linfócitos T, como as células NK não produzem o IFN- γ . Para o fazerem necessitam de diversos estímulos, como a presença de agentes patogénicos e dos seus antígenos; e de citocinas como a IL-12, IL-2 e IL-18 (Chan, et al., 1991; Manetti, et al., 1993; Handa, Suzuki, Matsui, Shimizu, & Kumagai, 1983; Kasahara, Hooks, Dougherty, & Oppenheim, 1983; Yoshimoto, et al., 1998). O IFN- γ apresenta ainda efeito sinérgico com o M-CSF e o TNF- α (Munn, Beall, Song, Wrenn, & Throckmorton, 1995; Ohmori, Schreiber, & Hamilton, 1997). O sinergismo com o TNF- α depende do grau de diferenciação dos macrófagos alvo, sendo que este inibe a expressão de moléculas de MHC classe II estimulada pelo IFN- γ em macrófagos maduros, exercendo o efeito contrário em macrófagos não diferenciados (Watanabe & Jacob, 1991).

A produção de IFN γ é inibida por glucocorticoides; pela IL-10; pela PGE2 e pela IL-4 (Hu, Li, Meng, & Ivashkiv, 2003; D'Andrea, et al., 1993; Snijdwint, Kalinski, Wierenga, Bos, & Kapsenberg, 1993; Tanaka, Hu-Li, Seder, de St. Groth, & Paul, 1993); e tem como antagonistas dos seus efeitos a IL-10, IL-4, Interferões de tipo I e TGF β (Gazinelli, Oswald, James, & Sher, 1992; Gautam, Tebo, & Hamilton, 1992; Fertsch, Schoenberg, Germain, Tou, & Vogel, 1987; Ling, Warren, & Vogel, 1985; Ding, et al., 1990).

Tem recetores em praticamente todas as células e, devido à sua estrutura simétrica, é capaz de se ligar a dois recetores idênticos simultaneamente (Griggs, Jarpe, Pace, Russell, & Johnson, 1992). Esses recetores são chamados de INF- γ R e são constituídos por 2 duas glicoproteínas: a IFNGR1 e a IFNGR (Shankaran & Schreiber, 2000). A IFNGR2 não se encontra nos linfócitos Th1 (Pernis, et al., 1995).

Apesar dos seus recetores serem espécie-específicos, a sequência aminoacídica e a glicosilação do IFN- γ são semelhantes entre espécies (Kaiser, Wain, & Rothwell, 1998). O IFN- γ dos golfinhos apresenta elevada identidade com o IFN- γ bovino (86%), mas baixa identidade com o IFN- γ humano (63%) (Inoue, Itou, Oike, & Sakai, 1999).

O INF- γ é importante em todas as fases da resposta imune, desde o início com a resposta inespecífica, ativando macrófagos e células endoteliais; à transição para resposta adquirida, através do aumento da expressão de moléculas de MHC nas APC; à estimulação da resposta adquirida; e à manutenção ou interrupção da inflamação final:

Nos macrófagos, o IFN- γ tem a capacidade de aumentar o seu metabolismo oxidativo e “burst respiratório”, resultando no aumento da produção de oxidantes como H₂O₂ e aumentando a sua capacidade para destruir agentes patogénicos intracelulares (Nathan, Murray, Wiebe, & Rubin, 1983); tem também a capacidade de induzir a produção de NO, que confere a capacidade de induzir morte celular noutras células e induz a vasodilatação nos locais de inflamação (Kamijo, et al., 1993; Tizard, 2009); e tem ainda a capacidade de induzir a produção de algumas quimiocinas, enquanto inibe a produção de outras induzidas por LPS (Marfaing-Koka, et al., 1995; Van Coillie, et al., 1997; Ohmori & Hamilton, 1994). Sinergicamente com o M-CSF promove a maturação dos macrófagos e evita a sua apoptose (Munn, Beall, Song, Wrenn, & Throckmorton, 1995). O IFN- γ tem também a capacidade de aumentar a expressão de moléculas de adesão, como a ICAM-1 em várias células, especialmente células endoteliais e queratinócito (Dustin, Singer, Tuck, & Springer, 1988). Para além disto, apresenta também outros efeitos nos macrófagos e células endoteliais, como aumentar a sua capacidade de produzir IL-1 e estimular a produção de quimiocinas (Arenzana-Seisdedos, Virelizier, & Fiers, 1985; Miossec & Ziff, 1986; Marfaing-Koka, et al., 1995). Na transição para a resposta adquirida, induz a expressão de moléculas de MHC classe II nas APC; aumenta a expressão de moléculas de MHC classe I em células alvo para linfócitos T citotóxicos (como células tumorais ou infetadas com vírus e outros agentes intracelulares); induz a expressão da proteína membrana B7 (CD80/86), que é

indispensável para que haja co-estimulação dos linfócitos T (Akbar, Inaba, & Onji, 1996; Freedman, Freeman, Rhyhart, & Nadler, 1991; Zhou, 2009). Estimula também a proliferação de linfócitos T, principalmente linfócitos T citotóxicos CD8+ juntamente com a IL-2 (Landolfo, et al., 1988; Maraskowsky, Chen, & Shortman, 1989).

Em relação à resposta humoral, o IFN- γ apresenta efeitos contraditórios, suprimindo a proliferação de linfócitos Th2 estimulados pela IL-2 e IL-4; inibido a diferenciação dos linfócitos B ativados; estimulando, no entanto, a produção de imunoglobulinas policlonais por parte de linfócitos B, quer ativados, quer inativos (Fernandez-Botran, Sanders, Mosmann, & Vitetta, 1988; Gajewski & Fitch, 1988; Abed, Chace, & Cowdery, 1994; Abed, Chace, Fleming, & Cowdery, 1994; Nakagawa, Hirano, Nakagawa, Yooshizaki, & Kishimoto, 1985; Xiang, Benson, & Dunn, 2001).

É também um inibidor da eritropoiese (Wang, Udupa, & Lipschitz, 1995). O IFN γ reduz as funções tiroideias, inibindo a expressão de recetores de TSH, a produção de T3, a expressão do gene da tiroglobulina e reduzindo os níveis basais de peroxidase (Nishikawa, et al., 1993; Kreaiem, Sobel, Sadeh, Kinarty, & Lahat, 1990; Kung & Lau, 1990; Asakawa, et al., 1992). Inibe a produção de prolactina, hormona de crescimento e ACTH pela hipófise (Vankelecom, et al., 1990). Modela a permeabilidade epitelial através de alterações no citoesqueleto das células (Adams, Planchon, & Roche, 1993; Flohr, Buwitt, Bonnekoh, Decker, & Böttger, 1992). O IFN- γ tem também um efeito antiviral através da já referida produção de NO e ao estimular outras proteínas antivirais, como Interferões classe 1 (Marziali, et al., 1991; Harris, Buller, & Karupiah, 1995). Nos fibroblastos, aumenta a expressão de moléculas de MHC classe II, conferindo-lhes a capacidade de estimular a proliferação de linfócitos Th1 e inibe a síntese de colagénio e fibronectina pelos fibroblastos e condrócitos, atuando de forma antagonista à IL-4 na fibrose (Sempowski, Derdak, & Phipps, 1996; Jiminez, Freundlich, & Rosenbloom, 1984; Amento, Bhan, McCullagh, & Krane, 1985).

O IFN- γ tem também alguma capacidade imunossupressora, estimulando células supressoras para reações de hipersensibilidade tardia; estimulando o aumento da produção de TGF β ; e inibe a co-estimulação pelas APC, inibindo a produção de gp39 (ligando do CD40), CD1A, CD80 e CD4 (Noma & Dorf, 1985; Tizard, 2009; Twardzik, et al., 1990; Roy, Waldschmidt, Aruffo, Ledbetter, & Noelle, 1993; Rungcun, et al., 1998). É também o principal indutor da apoptose em linfócitos T ativados sem a presença de co-estimulação (Liu & Janeway, 1990). O IFN- γ apresenta ainda a capacidade de induzir, nas células, a enzima IDO, que vai catalisar a conversão do triptofano, utilizando, neste processo, o anião superóxido, reduzindo o seu efeito nocivo e servindo como mecanismo autorregulador, ao mesmo tempo que priva os agentes patogénicos intracelulares dum composto essencial à sua síntese (Taylor & Feng, 1991). Outro efeito autorregulador do IFN- γ é a estimulação da apoptose dos macrófagos por si ativados quando deparados com um novo estímulo ativador

(Munn, Beall, Song, Wrenn, & Throckmorton, 1995). O IFN- γ é também um inibidor da produção de IL-10 (Chomarat, Risoan, Banchereau, & Miossec, 1993).

Para além dos seus efeitos benéficos, o IFN- γ apresenta também alguns efeitos nocivos em sinergia com o TNF α , como a caquexia em infeções crónicas e a morte em caso de choque séptico (Billiau & Matthys, 1992; Silva & Cohen, 1994).

2.4.2.4. Citoquinas da resposta Humoral – IL4, IL10, IL13, IL5 (IL1 e IL6)

2.4.2.4.1. IL-4

A Interleucina 4 – anteriormente chamada BCGF; BCDF γ , BSF-1 e BSF-p1 (Keegan, 2000) – é uma glicoproteína de 20kDa, com grande importância na regulação da resposta humoral (Tizard, 2009; Powers, et al., 1992). É produzida por linfócitos T, principalmente Th2; por células NK; por mastócitos, basófilos e eosinófilos estimulados pela IgE e por macrófagos alveolares (Pouliot, Turnel, Gélinas, Laviolette, & Bissonnette, 2005; Büttner, et al., 1997; Kidd, 2003; Tizard, 2009; Woerly, Roger, Loiseau, & Capron, 1999; Bradding, et al., 1992; Leite-De-Moraes, et al., 1998). Tem como indutor o TNF α e como antagonistas o IFN γ e a forma solúvel dos seus recetores (Feng, et al., 1997; Ma, Hurst, & Fernandez-Botran, 1996; Kidd, 2003; Sempowski, Derdak, & Phipps, 1996; Fernandez-Botran, Sanders, Mosmann, & Vitetta, 1988).

Apresenta dois recetores IL-4R – um de tipo 1, composto pela cadeia proteica IL-4R α ligada a uma cadeia comum gama; outro de tipo2, composto pela cadeia IL-4R α agregada a um recetor da IL-13: IL-13R α 1 (Keegan, IL-4 Receptor, 2000). A ligação à forma solúvel da IL-4R α pode aumentar o tempo de semivida da IL-4, servindo como proteína transportadora (Ma, Hurst, & Fernandez-Botran, 1996).

A IL-4 dos golfinhos apresenta uma elevada identidade com a IL-4 bovina (Inoue, Itou, Sakai, & Oike, 1999).

No geral, sabe-se que a IL-4 é a principal citoquina da resposta TH2, atuando como co-estimulante para o crescimento de linfócitos B e T e mastócitos, aumentando também a sobrevivência dos linfócitos B e protegendo-os da apoptose induzida pela Fas (Kidd, 2003; Tizard, 2009; O'Garra, et al., 1986; Spits, et al., 1987; Hamaguchi, et al., 1987; Acosta Rodriguez, Zuñiga, Montes, & Gruppi, 2003; Fernandez-Botran, Sanders, Mosmann, & Vitetta, 1988). Induz a expressão de moléculas de MHC classe II e outros recetores em várias células alvo (Acosta Rodriguez, Zuñiga, Montes, & Gruppi, 2003; Abdel-Salam, 2010; Lee, Yoon, & Pyun, 1993). Regula a diferenciação dos linfócitos Th CD4+ “naïve” em Th2; a diferenciação de linfócitos B em plasmócitos e regula a expressão das várias subclasses de imunoglobulinas (Kopf, et al., 1993; Kotowicz & Callard, 1993; Pène, et al., 1988; Moon, et al., 1989). Diminui as funções inflamatórias dos monócitos e macrófagos ao mesmo tempo que aumenta as suas características de apresentadores de antígenos. Nestes, a IL-4 aumenta a expressão de recetores IL-1Ra e inibe a síntese de citoquinas e enzimas pro-

inflamatórias, como a IL-1, TNF α , IL-6, IL12, M-CSF, COX2, PGE2 e quimiocinas (Vannier, Miller, & Dinarello, 1992; Levings & Schrader, 1999; te Velde, Huijbens, Heije, de Vries, & Figdor, 1990; Teloni, Giannoni, Rossi, Nisini, & Gagliardi, 2007; Standiford, et al., 1993; Marfaing-Koka, et al., 1995; Standiford, Strieter, Kasahara, & Kunkel, 1990; Gruber, Williams, & Gerrard, 1994). Está também envolvida na quimiotaxia dos diversos leucócitos, principalmente eosinófilos e macrófagos (Jain-Vora, Wert, Temann, Rankin, & Whitsett, 1988; Mochizuki, Bartels, Mallet, Christophers, & Schröder, 1998; Rollins & Pober, 1991).

Nas células dendríticas, estimula a diferenciação de DC1 e a apoptose de DC2 e inibe a produção de IL-10, estimulando a produção de IL-12 (Rissoan, et al., 1999; Yao, Li, Kaplan, & Chang, 2005).

Nos fibroblastos, induz a sua proliferação, quimiotaxia e contração; induz a síntese de colagénio, IL-6, proteínas da matriz extracelular e ICAM-1; e induz a diferenciação de miofibroblastos (Sempowski, Derdak, & Phipps, 1996; Huaux, Liu, McGarry, Ullenbruch, & Phan, 2003; Postlethwaite & Seyer, 1991; Liu, et al., 2002; Feghali, Bost, Boulware, & Levy, 1992; Postlethwaite, Holness, Katai, & Raghov, 1992; Piela-Smith, Broketa, Hand, & Korn, 1992). No entanto, em fases iniciais do processo cicatricial, tem efeitos antifibróticos, através da inibição de certas citocinas pro-inflamatórias e fatores de crescimento de fibroblastos, como TNF- α e o TGF- β , respetivamente (Huaux, Liu, McGarry, Ullenbruch, & Phan, 2003). Aumenta a expressão de VCAM-1 nas células endoteliais (McCarty, Yee, Deisher, Harlan, & Kaushansky, 1995). Diminui também a expressão de VLA-4 nos linfócitos T e aumenta a produção de TGF- β nos linfócitos T e eosinófilos (Sasaki, et al., 2009; Elovic, et al., 1998; Seder, et al., 1998). Juntamente com a IL-13, a IL-4 reduz a libertação de cloro pelas células epiteliais do intestino (Zünd, Madara, Dzus, Awtrey, & Colgan, 1996). Nos mastócitos, a IL-4 promove também a expressão de ICAM-1 (Valent, et al., 1991). Tem uma ação inibitória sobre a produção de IL-2 e IFN- γ pelos linfócitos T (Tanaka, Hu-Li, Seder, de St. Groth, & Paul, 1993).

Apresenta também algum efeito inibidor do crescimento de células cancerígenas, suprimindo a angiogénese (Volpert, et al., 1998).

2.4.2.4.2. IL-10

A Interleucina-10 – também conhecida como CSIF, MCSFIII e B-TCGF (de Waal Malefyt, 2000) – é uma citocina homodimérica característica da imunidade tardia (Tizard, 2009). Está presente em grandes quantidades em doenças crónicas, com grande atividade imunossupressora e anti-inflamatória, inibindo a síntese de citocinas tendo, no entanto, algumas funções estimuladoras.

É produzida por monócitos e macrófagos – principalmente M2; linfócitos T, principalmente Th2 e T reguladores; células NK; linfócitos B; células da micróglia; células dendríticas; mastócitos; trofoblastos placentários; células epiteliais brônquicas e alguns tumores (Tizard,

2009; Chabot, Williams, Hamilton, Sutherland, & Yong, 1999; Iwasaki & Kelsall, 1999; Sundstedt, O'Neill, Nicolson, & Wraith, 2003; Bennett, et al., 1997; Bonfield, et al., 1995; Gastl, et al., 1993; Mehrotra, et al., 1998; Carter, Rosser, & Mauri, 2012; Chan, St. John, & Abraham, 2013) (Dummer, et al., 1996).

A IL-10 apresenta diversos indutores e estimuladores: IL-2; IL-12; IFN α ; TNF α ; PGE₂; antígenos apresentados por APC; LPS; complexos imunes; catecolaminas; histamina; VIP e radiação UV (Mehrotra, et al., 1998; Aman, et al., 1996; Wanidworanun & Strober, 1993; Németh, et al., 2009; Nalos, Huang, Pandit, & McLean, 2006; Delgado, Munoz-Elias, Gomariz, & Ganea, 1999; Elenkov, Papanicolaou, Wilder, & Chrousos, 1996; Elenkov, et al., 1998; Enk, Sredni, Blauvelt, & Katz, 1995; Sutterwala, Noel, Salgame, & Mosser, 1998). É inibida pela IL-13, TGF β , IL-4, IFN γ e a própria IL-10 (Chomarat, Rissoan, Banchereau, & Miossec, 1993; Knolle, et al., 1998; Suberville, et al., 2001; Yao, Li, Kaplan, & Chang, 2005; de Waal Malefyt, et al., 1993a).

A IL-10 possui dois receptores: IL-10R α e IL-10R β (Kotenko, et al., 1997).

Dadas as suas características imunossupressoras, existem vírus que produzem proteínas homólogas, capazes de surtir o mesmo efeito (Hsu, et al., 1990; Chang, Baumgarth, Yu, & Barry, 2004; Fleming, McCaughan, Andrews, Nash, & Mercer, 1997; Suzuki, et al., 1995).

Os efeitos inibidores da IL-10 afetam inúmeras células. Nos macrófagos e monócitos, inibe a produção de diversas citocinas como a IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, IFN- γ , GM-CSF, G-CSF, M-CSF, TNF α , MIP-1 α , RANTES e até a própria IL-10 (Tizard, 2009; D'Andrea, et al., 1993; de Waal Malefyt, Abrams, Bennett, Figdor, & de Vries, 1991; Berkman, et al., 1995; Gruber, Williams, & Gerrard, 1994; Knolle, et al., 1998; Marfaing-Koka, Maravic, Humbert, Galanaud, & Emilie, 1996). Nos macrófagos, inibe também a expressão de várias proteínas de membrana como o MHC classe II, ICAM-1, CD80; aumenta a produção de IL-1Ra e a expressão da proteína solúvel p75 do TNFR, inibindo os efeitos pró-inflamatórios da IL-1 e TNF α (de Waal Malefyt, Abrams, Bennett, Figdor, & de Vries, 1991; Willems, et al., 1994; Dickensheets, Freeman, Smith, & Donnelly, 1997). Ainda nos macrófagos, reduz a produção de anião superóxido e de NO, diminuindo a capacidade de digestão de microrganismos; inibe a produção de PGE₂ de gelatinase e colagenase e aumenta a produção de inibidores de metaloproteinases (Kuga, et al., 1996; Cunha, Moncada, & Liew, 1992; Niino, et al., 1994; Lacraz, Nicod, Chicheportiche, Welgus, & Dayer, 1995). Nas células dendríticas, potencia a apoptose das DC2 estimulada pela IL-4; inibe a produção de IL12 e inibe a expressão e ativação de moléculas co-estimuladoras, como a CD80 e CD86, diminuindo a resposta pelos linfócitos T (Rissoan, et al., 1999; Yao, Li, Kaplan, & Chang, 2005; Buelens, et al., 1995). Nos Neutrófilos, diminui a produção de citocinas, quimiocinas e anião superóxido; diminui a sua sobrevivência e migração e, aumenta a produção de IL-1Ra (Cassatella, Meda, Bonora, Ceska, & Constantin, 1993; Kasama, Strieter, Lukacs, Burdick, & Kunkel, 1994; Chaves, Silvestrini, Silva-Teixeira, & Nogueira-Machado, 1996; Cox, 1996; Marie, Pitton, Fitting, &

Cavaillon, 1996). O mesmo acontece nos eosinófilos, diminuindo a sua sobrevivência e inibindo a produção de citocinas (Takanashi, et al., 1994). Nos mastócitos inibe a produção de TNF α e GM-CSF (Arock, Zuany-Amorim, Singer, Benhamou, & Pretolani, 1996). Nas células NK inibe diretamente a produção de IL-5 e indiretamente a produção de IFN γ e TNF α (D'Andrea, et al., 1993; Warren, Kinnear, Philips, & Lanier, 1995). Nos linfócitos B, os efeitos da IL-10 variam conforme o seu estado de diferenciação, induzindo a apoptose nas fases iniciais, mas inibindo-a em linfócitos B mais diferenciados (Itoh & Hirohata, 1995). Nos linfócitos T, inibe a produção de citocinas ativadas pelas APC, principalmente IL-2, IL-5, IL-6, TNF α , IFN γ (D'Andrea, et al., 1993; Hempel, et al., 1995; de Waal Malefyt, Yssel, & de Vries, 1993b; Schandené, et al., 1994). A IL-10 induz um estado de anergia nos linfócitos T ativados na sua presença e nos T CD4 $^{+}$ induz a sua apoptose, quando presente em grandes quantidades, como ocorre na septicemia em que é produzida continuamente pelos linfócitos circulantes (Groux, Bigler, de Vries, & Roncarolo, 1996; Ayala, Chung, Song, & Chaudry, 2001).

No entanto, a IL-10 apresenta também efeitos estimuladores: estimula a ação de quimiocinas nos macrófagos e neutrófilos, estimulando a expressão de receptores como o fMLP-R e o PAF-R (Thivierge, Parent, Stankova, & Rola-Pleszczynski, 1999); aumenta a produção de receptores para a porção Fc dos anticorpos em Macrófagos e Monócitos, aumentando a sua capacidade de fagocitar agentes patogênicos opsonizados (Capsoni, et al., 1995); induz a expressão de proteases nos mastócitos e age como cofator na estimulação da proliferação dos mesmos, juntamente com a IL-3 e IL-4 (Ghildyal, et al., 1992a; 1992b; 1993; Rennick, Hunte, Holland, & Thompson-Snipes, 1995). Nos linfócitos T CD8 $^{+}$, induz a sua proliferação e dos seus precursores e tem ação quimiotática para com eles (Rowbottom, et al., 1999; Chen & Zlotnik, 1991; Jinquan, Larsen, Gesser, Matsushima, & Thestrup, 1993). Os principais efeitos estimuladores da IL-10 estão envolvidos na resposta humoral. Nesta, ela aumenta a expressão de moléculas de MHC classe II pelos linfócitos B (Go, et al., 1990); aumenta a sua sobrevivência, induzindo a expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 (Levy & Brouet, 1994); aumenta a sua proliferação e dos seus precursores, sinergicamente com a IL-2 e IL-4 (Itoh & Hirohata, 1995; Rousset, et al., 1992); aumenta a expressão de receptores para a IL-2 (Fluckinger, Garrone, Durand, Galizzi, & Banchereau, 1993); e afeta a sua diferenciação e mudança de isotipo de imunoglobulinas (Rousset, et al., 1992). Apresenta também atividade antioncogênica, atuando sinergicamente com as células NK, inibindo a oncogênese, o desenvolvimento de metástases e estabelecendo células de memória protetoras (Zheng, et al., 1996; Giovarelli, et al., 1995).

Estimula linfócitos T reguladores, sendo importante no estabelecimento de tolerância (Chaudhry, et al., 2011).

2.4.2.4.3. IL-13

A interleucina-13 – também conhecida como proteína P600 e NC30 – é uma proteína com cerca 14 a 40kDa, com funções anti-inflamatórias e de modulação da resposta Th2 (McKenzie & Matthews, 2000). É inicialmente produzida como um péptido monomérico de 10kDa, que sofre glicosilações após a sua secreção (McKenzie, et al., 1993).

É produzida principalmente por linfócitos CD4⁺ Th2, mas também por mastócitos, células NK, células dendríticas, macrófagos alveolares e algumas células cancerígenas (Burd, Thompson, Max, & Mills, 1995; Hoshino, Winkler-Pickett, Mason, Ortaldo, & Young, 1999; Bellinghausen, et al., 2003; Kang, et al., 2005; Skinnider, et al., 2001; de Waal Malefyt R. , et al., 1995). Linfócitos Th1, Th0 e CD8⁺ e basófilos também demonstram capacidade de expressar a IL-13 (de Waal Malefyt R. , et al., 1995; Ochensberger, Daepp, Rihs, & Dahinden, 1996).

A sua produção é ativada pela ligação de antígenos aos recetores TCR em linfócitos; pela ligação de IgE nos mastócitos, pela ação da IL-2 e IL-18 nas células NK e pela ação de alérgenos nas APC (de Waal Malefyt R. , et al., 1995; Burd, Thompson, Max, & Mills, 1995; Hoshino, Winkler-Pickett, Mason, Ortaldo, & Young, 1999; Hoshino, Wiltout, & Young, 1999; Bellinghausen, et al., 2003; Kang, et al., 2005).

Possui três recetores: IL-13R α 1; IL-13R α 2 e IL-4R α . O segundo atua como inibidor competitivo endógeno e o terceiro, apesar de não se ligar diretamente à IL-13, serve para aumentar a afinidade do IL-13R α 1 (Matthews & McKenzie, 2000).

Tem uma identidade de cerca de 30% com a IL-4, sendo que as suas funções estão relacionadas (Huax, Liu, McGarry, Ullenbruch, & Phan, 2003).

As suas principais funções são a indução da proliferação de linfócitos B; a indução da produção de IgG, IgM e da mudança do isotipo para IgE; e estimulação da expressão das proteínas de membrana CD23, CD71, CD72 e molécula de MHC classe II nessas células (Punnonen, et al., 1993). Diminui a quimiotaxia, tanto para os linfócitos T CD4⁺ como para os CD8⁺ (Jinquan, et al., 1995). Nos monócitos e macrófagos, aumenta a expressão de CD23, moléculas de MHC classe II e membros a família das integrinas, assim como aumenta a sua quimiotaxia ao estimular a produção de MCP-1 pelas células endoteliais (de Waal Malefyt, et al., 1993a; Goebeler, et al., 1997). No entanto, as suas funções nestas células são maioritariamente anti-inflamatórias, estimulando a expressão de IL-1Ra e diminuindo a expressão de CD16, CD32, CD64 e CD14, reduzindo a produção de IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, G-CSF, TNF α , IL-12 e NO e ainda antagoniza os efeitos do TNF α (de Waal Malefyt, et al., 1993a; Doherty, Kastelein, Menon, Andrade, & Coffman, 1993; Manna & Aggarwal, 1998). Nos neutrófilos, induz a produção de COX-2, PGE2, recetor de complemento tipo 1 e tipo 3 e IL-1Ra (Yu, et al., 1998; Colotta, et al., 1994). Nos fibroblastos, tem funções estimuladoras semelhantes à IL-4 (Huax, Liu, McGarry, Ullenbruch, & Phan, 2003). Nas células endoteliais aumenta a permeabilidade vascular,

induz a expressão de VCAM-1, MCP-1 e a produção de IL-6 e estimula a produção de osteoprotegerina (OPG), diminuindo a ação dos osteoclastos e a absorção óssea (Kotowics, Callard, Friedrich, Matthews, & Klein, 1996; Sironi, et al., 1994; Goebeler, et al., 1997; Stein, et al., 2008). A IL-13 estimula a proliferação dos fibroblastos, juntamente com a IL-4 (Huau, Liu, McGarry, Ullenbruch, & Phan, 2003). É um dos principais intervenientes nas alergias, aumentando a expressão de eotaxina, levando à quimiotaxia dos eosinófilos; estimulando a produção de IgE e estimulando a inflamação e secreção de muco pelas vias respiratórias (Zhu, et al., 1999; Punnonen, et al., 1993). Tem um papel central na expulsão de parasitas gastrointestinais, estimulando a hiperplasia das células caliciformes e consequente produção de muco nos intestinos (McKenzie, Bancroft, Grencis, & McKenzie, 1998).

2.4.2.4.4. IL-5

A Interleucina-5 – também conhecida como BCGFII, TRF, EDF e Eo-CSF (Schwenger, et al., 2000) – é uma glicoproteína homodimérica com cerca de 45 a 60kDa cuja ação se encontra centrada na atividade dos eosinófilos (Tominaga, et al., 1990).

É produzida por linfócitos T CD4+ ativados, principalmente Th2; células NK; mastócitos; eosinófilos (não o suficiente para a sua própria manutenção) e por células do endotélio microvascular da medula óssea (Hogan, Koskinen, Matthaei, Young, & Foster, 1998; Warren, Kinnear, Philips, & Lanier, 1995; Barata, et al., 1998; Möhle, Salemi, Moore, & Rafii, 1997). Enquanto os linfócitos T libertam a IL-5 à medida que é produzida, os mastócitos e eosinófilos armazenam-na em grânulos do retículo endoplasmático (Barata, et al., 1998).

A sua produção é estimulada pela presença de parasitas e antígenos parasitários no organismo, estímulos alérgicos, assim como pela PGE2, histamina, IL-4 e IL-2 (Warren, Kinnear, Philips, & Lanier, 1995; Garfias, et al., 2006; Hagan, et al., 1996; Snijdwint, Kalinski, Wierenga, Bos, & Kapsenberg, 1993; Schmidt, Fleissner, Heimann-Weitschat, Lindstaedt, & Szelenyi, 1994; Saraya & Balkwill, 1993).

É inibida por glucocorticoides, IFN γ , IFN α , IL-10 e IL-12 (Warren, Kinnear, Philips, & Lanier, 1995; Schandené, et al., 1994; 1996; Corrigan, et al., 1993).

O recetor da IL-5 é composto por duas subunidades: IL-5R α , que é específica e desenvolve uma ligação de afinidade moderada que não desenvolve sinal e a IL-5R β , que não é específica, sendo partilhada com os recetores da IL-3 e GM-CSF e que aumenta a afinidade da IL-5R α desenvolvendo sinal (Bagley, Tavernier, Woodcock, & Lopez, 2000).

A sua principal função é induzir a produção, ativação e quimiotaxia dos eosinófilos (Yamaguchi, et al., 1988). Nos basófilos, estimula a sua diferenciação a partir das células progenitoras, assim como induz a produção de histamina e leucotrienos por estes (Denburg, Silver, & Abrams, 1991; Bischoff, Brunner, De Weck, & Dahinden, 1990). Nos linfócitos B, induz alguma diferenciação, proliferação e produção de IgA; aumenta a sua sobrevivência e

aumenta a expressão de recetores da IL-2 (Horikawa & Takatsu, 2006; Moon, Takaki, Miyake, & Takatsu, 2004; Loughnan, Takatsu, Harada, & Nossal, 1987).

3. Objetivos

Como já referido, a avaliação do estatuto sanitário dos cetáceos, através da resposta imunitária, permite aferir a integridade dos ecossistemas oceânicos. No entanto, a informação sobre o funcionamento do sistema imunitário e citoquinas disponível na bibliografia sobre esses animais, ainda que em permanente crescimento, é relativamente escassa, quando comparada à informação sobre animais domésticos e o Homem. A manipulação de golfinhos em vida é proibida por lei, tornando a obtenção de informação bastante difícil. Como alternativa, Hoffman et al (2013) utilizaram um método de extração de RNA total em amostras *post mortem* de focas, revelando-se uma alternativa viável à utilização de animais vivos em estudos que envolvam recolha de material biológico como sangue e fragmentos de órgãos, necessários para a melhor compreensão dos vários tipos de respostas e da fisiopatologia dos vários agentes patogénicos que podem afetar esses animais. A determinação de quais os genes a serem expressos no momento da morte do animal e as suas proporções relativas pode ser realizada através da análise do mRNA. Desta forma, conhecendo o perfil de expressão das citoquinas responsáveis pela regulação das diferentes respostas imunes é possível estabelecer o estatuto sanitário do animal e compreender quais os elementos do SI em ação. Diferentes autores utilizaram esta metodologia com diferentes objetivos, nomeadamente:

- Fonfara et al (2007) na determinação da resposta imunitária em situações de *stress*, pela análise dos perfis de expressão de citoquinas e de proteínas de fase aguda no sangue de toninha-comum (*Phocoena phocoena*) expostos a elevados níveis de *stress*;
- Sitt et al (2010) para avaliação da resposta vacinal em golfinhos-roaz (*Tursiops truncatus*) imunizados contra a erisipela porcina;
- Svitek & von Messling (2007) para avaliação da resposta a agentes patogénicos específicos em furões (*Mustela putorius furo*) infetados com morbilivirus;
- Buckman et al (2011) para determinação do impacto de poluentes em orcas (*Orcinus orca*) expostos a PCB (polychlorinated biphenyl).

Desta forma, o objetivo inicial deste trabalho era avaliar o perfil de resposta imunitária desencadeado pela infeção por morbilivirus dos cetáceos (CeMV). No entanto, devido ao tamanho da amostra, os resultados preliminares não foram estatisticamente relevantes, não sendo por isso apresentados (ANEXO 2). Ainda assim, o perfil dos mediadores imunitários de um grupo controle foi efetuado, possibilitando a realização futura desse estudo e de outros semelhantes, com um número significativo de animais positivos a CeMV.

Assim, os objetivos deste trabalho foram:

- I. Estabelecer um protocolo experimental eficaz na avaliação da expressão de mediadores imunitários em cetáceos arrojados ou obtidos em capturas acidentais, de forma a avaliar o seu estatuto sanitário.
- II. Esclarecer a possibilidade de estabelecer um grupo controlo composto por animais “sãos”, utilizando animais de vida livre, expostos a diferentes estímulos ambientais.
- III. Comparar diferentes órgãos e demonstrar a sua fiabilidade para este tipo de estudos.
- IV. Avaliar um grupo de citocinas representativo dos vários tipos de resposta: inflamação aguda (TNF- α , IL-1 β e IL-6); imunidade celular (IL-12); imunidade humoral (IL-4, IL-10,) e fase de recuperação da resposta imunitária e imunossupressão (IL-10).

4. Materiais e Métodos

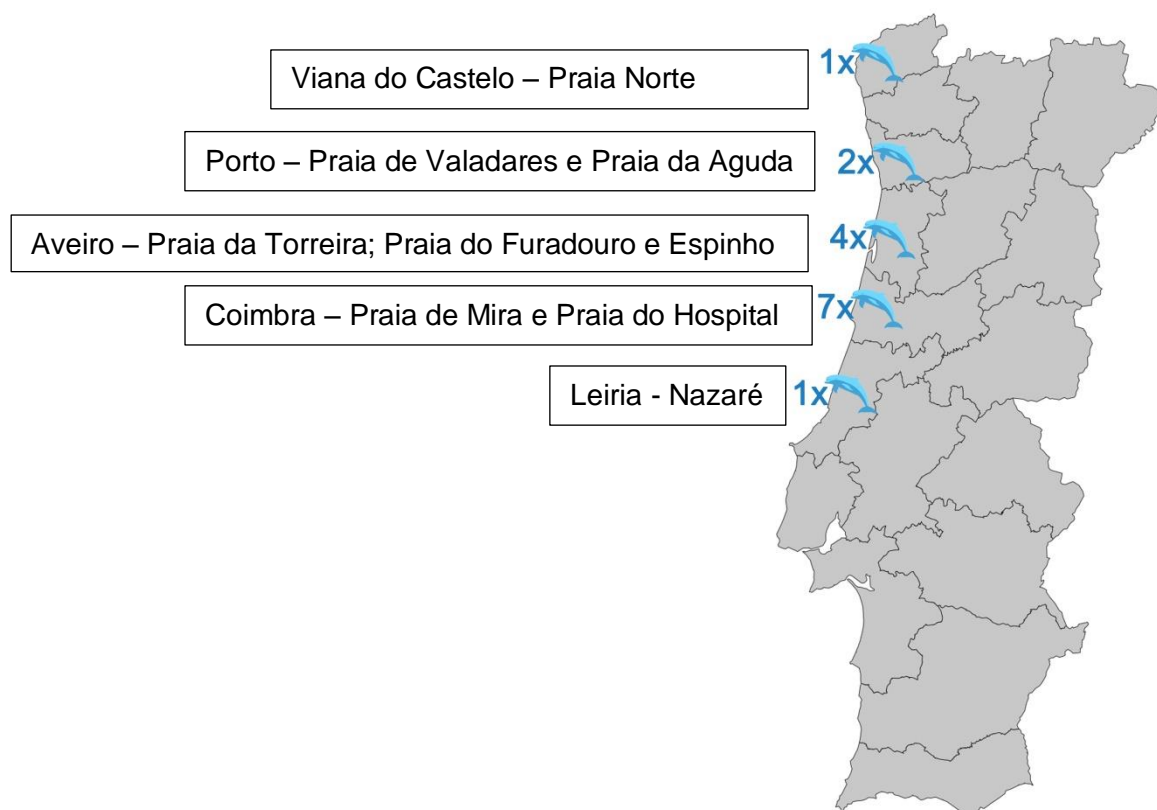
4.1. População animal e amostragem

As amostras utilizadas neste trabalho foram recolhidas, após necropsia, de animais de vida livre, arrojados ou capturados acidentalmente em redes na costa Portuguesa, no âmbito da rede nacional de arrojamentos, coordenada pela SPVS, para Portugal Continental. Os materiais processados pertenciam a golfinhos comuns (*Delphinus delphis*; DD)

4.2. Seleção dos animais

Com base nas informações recolhidas nas respetivas fichas de necropsia, foram selecionados 15 animais (9 fêmeas e 6 machos) para o grupo controlo, que foram considerados “sãos” dentro dos padrões de normalidade tendo em conta tratarem-se de animais de vida livre (ANEXO 1). Os critérios de seleção incluíam a seguinte avaliação: baixa carga parasitária, boa condição de estado geral, sem alterações macroscópicas relevantes, com alimento no estômago e boas camadas de gordura, com sinais de morte por captura evidentes e negativos no rastreio molecular para deteção de Morbilivirus e Herpesvirus de cetáceos. Alguns animais apresentavam alterações macroscópicas, não tendo sido, no entanto, consideradas relevantes, podendo estar associadas ao processo de captura. As amostras processadas foram todas recolhidas de animais apanhados por redes em capturas acidentais, por barcos pertencentes a várias capitánias da costa Portuguesa (Figura 5).

Figura 5 - Distribuição das capturas acidentais por distrito



4.3. Preparação e recolha de amostras

Fragmentos dos linfonodos pulmonares e pulmão foram recolhidos para RNA Later (Qiagen, Alemanha) durante a necropsia e colocados a 4° C durante 24h, tendo sido posteriormente armazenados a -20°C até à sua utilização.

4.4. Técnica laboratorial

4.4.1. Extração RNA

A extração do RNA total a partir de linfonodo pulmonar e pulmão foi efetuada com o kit “RNEasy® Mini kit” (Qiagen, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante.

Para a lise celular foi retirado um fragmento de cada órgão com peso inferior a 30mg e colocado num microtubo de 2ml, ao qual foram adicionados 600µl de Buffer RLT com 1% de β-mercaptoetanol e uma conta metálica de 0.5 cm de diâmetro. Em seguida, o tecido foi homogeneizado mecanicamente num TissueLyser™ (Qiagen, Alemanha) a 25Hz por 2 minutos, seguido de centrifugação durante 3 minutos a 16.000G e o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo, ao qual foi adicionado o mesmo volume (600µl) de etanol a 70%, para precipitação e desidratação do RNA; a mistura foi transferida para uma coluna de sílica e centrifugado a 8.000G por 15 segundos, para fixação do RNA à coluna. Após lavagem com os dois tampões de lavagem (1 lavagem com RW1; duas lavagens com RPE), nas mesmas condições de centrifugação, o RNA foi eluído da coluna, com 50µl de RNase-free water, quantificado num Nanodrop™ 2000c e conservado a -80°C até à sua utilização.

4.4.2. Tratamento com DNase

A eliminação do DNA genómico foi efetuada através dum tratamento enzimático com DNase I (Invitrogen™), de acordo com as instruções do fabricante.

Brevemente, a 1 µg de RNA, foi adicionado 1 µl de tampão de reação 10x; 1 U de DNase I; água elix até um volume total de 10 µl e a reação foi incubada a 37°C durante 1 hora, seguida da inativação da enzima com 1 µl de EDTA a 65°C/10min.

4.4.3. Transcrição Reversa

A transcrição reversa do RNA, previamente tratado com DNase, foi efetuada com o kit “Transcriptor Reverse Transcriptase®” (Roche™), de acordo com as instruções do fabricante. A ligação dos *primers* à cadeia de RNA e a desnaturação das estruturas secundárias do mesmo foi efetuada pela adição de 50pmol de *primers* oligo(dT)₁₈ a cada tubo com 1µg de RNA e seguida de incubação a 65°C durante 10min, sendo imediatamente arrefecido em gelo. Para a síntese do cDNA, foram adicionados 4 µl de tampão de reação 5X; 20 U de um inibidor de RNases; 20 µM de dNTP; 100 µM de DTT e 10 U de transcriptase reversa. A incubação foi feita a 50°C durante 1 hora, seguida de um passo a 65°C por 5 minutos para inativação da enzima.

4.4.4. Escolha de primers

A seleção dos *primers* foi feita através do programa Primer-Blast do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome). Para cada interleucina e para o gene de referência, foram selecionados pares de *primers* específicos (Tabela 1), assegurando que pelo menos um dos *primers* se localizava na junção entre dois exões, no mRNA, de forma a garantir a distinção entre DNA genômico e cDNA.

Tabela 1 - Primers

Gene	Primer	Sequência	Número de acesso
RPL7 ^a	Forward	5' TGC TGT GCC AGA AAC CCT TA 3'	XM_007453712
	Reverse	5' TCC TTG CCT TTC GAA GCA TCT 3'	
YWHAZ ^a	Forward	5' GCA AAA GAC GGA AGG TGC TG 3'	XM_007465733
	Reverse	5' TGC TTG TGA AGC ATT GGG GA 3'	
IL4	Forward	5' GGC ATG TAC CAG CAA CTT CG 3'	XM_007188557 XM_007461337
	Reverse	5' TGC TGT CAG GAT GTT CAG CG 3'	XM_004279901 XM_007106263
IL6	Forward	5' GCA TCG AGG CTG TGC AGA TT 3'	AF076643 XM_004263443
	Reverse	5' GTT GGG TCA GGG GTG GTT AC 3'	XM_004330286
IL10	Forward	5' GCC CTG TGA AAA CAA GAG CA 3'	AB775207 XM_004312229
	Reverse	5' ATG GCT TTG TAG ACA CCC TT 3'	XM_004282421 XM_007470712 XM_007171565 XM_007100340 U93260.
IL12	Forward	5' TTC CAG TGC CTC AAC CAC TC 3'	XM_007454130 XM_007110551
	Reverse	5' CCT CCA CTG TGC TGG TTC TA 3'	XM_007187073 XM_004281851 XM_004324402
TNF α	Forward	5' GGG AAG AGT TCC CAA CTG GC 3'	XM_004286610 GQ141103
	Reverse	5' GCA TAT GTG TTC AGC CAC CG 3'	DQ340436 AF320323 NM_001280615 AB049358 XM_007459580 XM_007193976 XM_007110157
IL1 β	Forward	5' CCC ACC AAC GAA GTG ATG GC 3'	AF320322.1
	Reverse	5' GTG GGA GAT TTG CAG GTG GA 3'	

^a: gene de referência

4.4.5. qPCR/PCR convencional

A avaliação da expressão das citocinas foi efetuada por PCR quantitativo, em placas de 96 poços, de acordo com a Tabela 2.

As reações foram preparadas numa área reservada, tendo sido efetuadas no volume final de 12,5 µl, com SYBR®green mix 2x (ThermoScientific), 400nM de *primer forward* e *reverse* e 25ng de cDNA. A reação de amplificação foi efetuada no termociclador em tempo real StepOnePlus (Applied Biosystem) com o ciclo de amplificação de 95°C durante 10 minutos para eliminação de estruturas secundárias do cDNA molde, seguido de 45 ciclos de amplificação a 90°C/ 15segundos e 60°C/ 1minuto.

Após observação de uma única curva de dissociação, para cada produto de amplificação, os produtos foram clonados num vetor plasmídico e utilizados posteriormente para calcular as eficiências e sensibilidades da reação.

Sempre que a clonagem do produto do qPCR num plasmídeo apresentava dificuldades devido à reduzida dimensão do fragmento, foram calculados *primers* externos, para amplificação por PCR convencional de um produto de amplificação de maiores dimensões.

Tabela 2 - Esquema Placa qPCR

A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	C-	C-
A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	C-	C-
A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	C-	C-
A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	C-	C-
A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	C-	C-
A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	C-	C-
A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	C-	C-
A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	C-	C-

Legenda: A = Amostra; Cores = Citoquinas; Cinzento = Genes Referência; C- = Controlo Negativo

Para execução do PCR convencional as reações foram preparadas numa área reservada, tendo sido efetuadas no volume final de 25 µl, com 5 PRIME® MasterMix 2,5x, 400nM de *primer forward* e *reverse* e 25ng de cDNA. A reação de amplificação foi efetuada no termociclador Prime (Techne®) com o ciclo de amplificação de 95°C/ 2 minutos para eliminação de estruturas secundárias do cDNA molde, seguido de 40 ciclos de amplificação: 95°C/ 30segundos, 56-60°C/ 30segundos, 72°C/ 30segundos; finalizando com um passo de extensão a 72°C/ 7 minutos.

Para cada citocina, foram utilizados dois controles negativos.

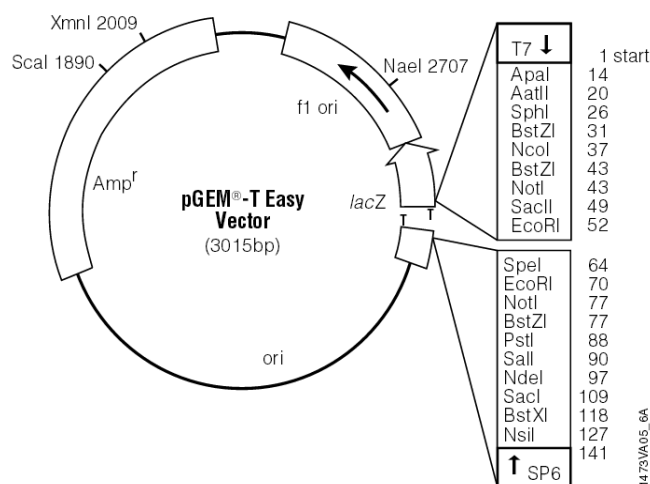
4.4.6. Purificação dos produtos

A purificação dos produtos de amplificação foi efetuada de duas formas: purificação do fragmento a partir de gel de agarose com o kit “Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit” (Zymopresearch™); purificação direta dos produtos obtidos na reação de amplificação com o kit “DNA Clean & Concentrator” (Zymopresearch™), de acordo com as instruções do fabricante. Para a purificação a partir de agarose, o produto de amplificação, com o peso molecular esperado, foi excisado da agarose, com o auxílio dum bisturi. Após pesagem, num microtubo de 2ml, adicionaram-se 3 volumes de tampão de dissolução e incubou-se a 55° durante 10 minutos. Após a dissolução completa da agarose, a amostra foi transferida para uma coluna de sílica e centrifugada durante 60 segundos a 10.000G, para fixação do DNA à coluna. Após lavagem com tampão de lavagem, nas primeiras condições de centrifugação, a coluna foi colocada num microtubo de 1,5ml e o DNA foi eluído da membrana após adição de 10 µl de tampão de eluição nas mesmas condições de centrifugação. Após quantificação do DNA no Nanodrop™ 2000c, foi conservado a -20°C até à sua utilização. Para purificação direta do produto de amplificação, adicionou-se ao volume de reação 5 volumes de tampão de ligação e transferiu-se para uma coluna de sílica. O processo de lavagem e eluição do DNA foi semelhante ao protocolo acima descrito.

4.4.7. A tailing

A clonagem dos produtos de amplificação foi efetuada no vetor plasmídico pGEM® T Easy (Figura 6) linearizado, com extremidades coesivas dT, no extremo 5'. Para garantir a ligação dos produtos de amplificação ao plasmídeo, as extremidades dos produtos de amplificação foram preenchidas com dA, através da ação da Taq DNApolimerase, na presença de dATP e tampão de reação. O ciclo de polimerização inclui um ciclo a 70°C durante 30 minutos.

Figura 6 - Mapa pGEM-T Easy Vector



Fonte: Promega Corporation. (2015). *pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems Technical Manual*. Obtido em 2 de Dezembro de 2015, de Promega: <https://www.promega.ro/resources/protocols/technical-manuals/0/pgem-t-and-pgem-t-easy-vector-systems-protocol/>

4.4.8. Ligação (pGEM)

Para a ligação utilizou-se 50 ng de plasmídeo pGEM® T easy. O cálculo da concentração do *insert* foi efetuado de acordo com a seguinte fórmula:

$$\frac{50\text{ng vetor} \times \text{kbp insert}}{3\text{ kb vetor}} \times \frac{3}{1} = x\text{ ng insert}$$

A reação de ligação foi efetuada no volume final de 10 µl, com 5µl de tampão de ligação “2X Rapid Ligation Buffer”; 1 µl de plasmídeo (50ng); 1 µl de T4 ligase (1U) e o volume calculado de *insert*. A reação foi incubada durante 1 hora à temperatura ambiente, seguida duma incubação “*over night*” a 4°C.

4.4.9. Transformação

A transformação consiste na introdução de um plasmídeo recombinante numa célula bacteriana competente. Foram utilizadas células de *Escherichia coli* DH5α competentes congeladas a -80°C em microtubos de 1,5ml com um volume de aproximadamente 200 µl. Após descongelação em gelo, adicionaram-se às células 5 µl de reação de ligação, pipetando cuidadosamente. Após 20 minutos de incubação em gelo, foi aplicado um choque térmico a 42° durante 50 segundos para promover a entrada do plasmídeo nas células, seguido de 2 minutos em gelo. Seguidamente, as células foram transferidas para tubos de 50 ml com 950 µl de meio SOC líquido e incubadas durante 1 hora e 30 minutos a 37°C numa estufa orbital com agitação a 200rpm. Este passo permite a recuperação das células ao choque térmico no meio de enriquecimento SOC. A incubação é efetuada em tubos de 50 ml numa estufa com agitação para promover a recuperação em aerobiose. Após recuperação, as células foram transferidas para microtubos de 2ml e centrifugadas a 1500G durante 10 minutos. Após descartar 800 µl do sobrenadante, o sedimento celular foi cuidadosamente ressuspensionado no restante volume, que foi semeado em toalha em duas placas de agar LB com 100 µg/ml de Ampicilina e 100mM de IPTG e 1 mg X-GAL, para permitir o *screening* das colónias recombinantes. As placas foram incubadas a 37°C 12-18h. O pGEM contém o gene de resistência à ampicilina e o seu local de clonagem interrompe o gene da β galactosidase¹. Desta forma, colónias bacterianas, transformadas pelo plasmídeo recombinante vão desenvolver-se e apresentar uma cor branca, contrastando com a cor azul das colónias transformadas pelo plasmídeo circularizado, não recombinante.

As colónias selecionadas foram repicadas e semeadas por estrias em placas Amp/IPTG/XGal.

¹ O IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) é um reagente que imita a alolactose, ativando a transcrição dos genes da β-galactosidase, permitindo a hidrólise do X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside). Quando este composto é hidrolisado forma metabolitos que conferem a cor azul ao meio.

4.4.10. Seleção de recombinantes por qPCR

O *screening* dos plasmídeos recombinantes foi efetuado por PCR quantitativo em placas de 96 poços, de acordo com a Tabela 2. As células recombinantes foram recolhidas com o auxílio de ansas de 1 µl e homogeneizadas em água estéril.

As reacções foram preparadas numa área reservada, tendo sido efetuadas no volume final de 20 µl, com SYBR®green mix 2x, 400nM de *primer forward* e *reverse* e 2 µl da diluição de células. Por questões de gestão laboratorial, nesta fase, foi usado o termociclador em tempo real 7300 (Applied Biosystems), com o ciclo de amplificação de 95°C durante 10min para desnaturação do DNA molde, seguido por 45 ciclos de amplificação a 90°C/ 15segundos; 60°C/ 1minuto.

Após observação da curva de amplificação, com uma única curva de dissociação e confirmação da presença do *insert*, foi feito um *stock* das células selecionadas; o DNA plasmídico foi extraído e enviado para sequenciação, para confirmação da especificidade do fragmento inserido.

4.4.11. Stock de bactérias

As colónias selecionadas pelo *screening* foram recolhidas com auxílio de uma ansa de 1 µl e colocadas em tubos de 50ml com 10ml de meio LB com 100µg/ml de ampicilina e incubadas durante 12-18h, numa estufa com agitação. Após incubação foram retirados 2 ml para *stock* das bactérias recombinantes, com 50% glicerol e congeladas a -80°C. O restante volume foi utilizado para extração do DNA plasmídico.

4.4.12. Extração de DNA plasmídico

A extração do DNA plasmídico foi efetuada com o kit “ZR Plasmid Miniprep™ Classic” (Zymo Research), segundo as instruções do fabricante. Após centrifugação a 4650G durante 10 minutos, foi descartado o sobrenadante e adicionados 200 µl de P1 Buffer. As células foram ressuspendidas e transferidas para um microtubo de 2ml, sendo adicionados 200 µl de P2 Buffer. A homogeneização foi efetuada por inversões sucessivas do tubo, até a solução se tornar transparente, roxa e viscosa, devido à lise celular. Foram adicionados 400 µl de P3 Buffer e homogeneizados gentilmente por inversões sucessivas, de forma a não fragmentar o DNA genómico bacteriano, evitando assim a contaminação do DNA plasmídico. Após incubação durante 2 minutos à temperatura ambiente foi centrifugado a 18.000G durante 3 minutos e o sobrenadante transferido para uma coluna de sílica. A coluna foi centrifugada a 16.000G durante 30 segundos e o eluído foi descartado. Após lavagem com os tampões de lavagem, nas mesmas condições de centrifugação, a coluna foi colocada num microtubo de 1,5 ml e o DNA foi eluído da membrana após adição de 10µl de tampão de eluição nas mesmas condições de centrifugação.

4.5. Sequenciação

Todas as sequenciações efetuadas, foram realizadas pela StabVida, Portugal.

4.6. Curva standard

A sensibilidade e eficiência foram determinadas por PCR quantitativo em placas de 96 poços, amplificando diluições sucessivas na base 10 do plasmídeo recombinante. As reações foram preparadas numa área reservada, tendo sido efetuadas no volume final de 12,5 µl, com SYBR®green mix 2x, 400nM de *primer forward* e *reverse* e 2 µl da diluição plasmídeos. O ciclo de amplificação foi idêntico ao anteriormente referido para o termociclador StepOnePlus (Applied Biosystem).

Os resultados obtidos foram analisados no programa *Microsoft Excel®* 2010 e, através das suas funções, foi desenhada uma reta tendência, cujo coeficiente de determinação (R^2) indica a correspondência dos valores com a reta tendência e pode ser usado para avaliar a se o qPCR está otimizado (Real-time PCR handbook; Applied Biosystems, 2012). A reta é determinada a partir dum gráfico no qual o eixo dos X corresponde ao logaritmo do nº de cópias por ml e o eixo dos Y a média dos Ct correspondentes a essa diluição. O nº de cópias por ml corresponde, por sua vez, à multiplicação entre o nº de moléculas e a diluição. Para o cálculo do nº de moléculas seguiu-se a seguinte fórmula:

$$x = \frac{g/\mu l}{PMbp \times bp} \times NA$$

“g/µl” = concentração das moléculas; “PMbp” = peso molecular de cada par de bases; “bp” = nº de pares de bases e “NA” = constante de Avogadro

A eficiência foi calculada a partir da inclinação da reta, segundo a fórmula:

$$x = 10^{\frac{-1}{m}-1}$$

“m” = inclinação da reta (Real-time PCR handbook; Applied Biosystems, 2012)

4.7. Análise dos dados

Os resultados obtidos dos qPCR, foram exportados para o formato “.xls” e tabelados convenientemente utilizando o programa *Microsoft Excel®* 2010. Foram utilizados dois métodos para a análise dos dados: o método de “ $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ” (Livak & Schmittgen, 2001) e o método do algoritmo “Miner” (Zhao & Fernald, 2005). Ambos os métodos assentam na equação que descreve a amplificação exponencial do PCR:

$$X_n = X_0 \times (1+E)^n$$

Em que “ X_n ” é o de moléculas no ciclo “n” do PCRq; “ X_0 ” é o nº de moléculas inicial; “E” é a eficiência dos *primers* e “n” é número de ciclos (Livak & Schmittgen, 2001).

Considerando que o Ct é o ciclo a que o gene em questão atinge determinado nº de cópias (*threshold*), e que esse *threshold* é igual, tanto para o gene alvo, como para o gene referência, a equação pode ser simplificada em:

$$X_0 = \frac{1}{(1+E)^{Ct}}$$

No método “ $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ”, o valor da eficiência deve ser semelhante entre os vários genes em estudo; sendo determinado a partir duma reta, previamente referida, pelo que a equação passa a ser:

$$X_0 = 2^{(-\Delta\Delta Ct)}$$

Em que o $\Delta\Delta Ct$ é a diferença entre os ΔCt médio de dois grupos amostrais, sendo o ΔCt a normalização dos resultados através da diferença entre o Ct do gene alvo e o Ct do gene referência. O X_0 é a expressão relativa inicial, entre o gene alvo em relação ao gene referência.

No método algoritmo “Miner”, a eficiência é calculada pelo algoritmo, disponível no *website*: “http://ewindup.info/miner/data_submit.htm”, através dos dados referentes a todos os ciclos do PCR. É aplicada a equação simplificada da amplificação exponencial ao Ct do gene alvo e ao Ct do gene referência sendo dividido o valor do primeiro pelo segundo.

Em ambos os métodos, os valores obtidos no final são os valores da expressão relativa dos genes alvo em relação ao gene referência normalizados, passíveis de serem utilizados para análise estatística (Livak & Schmittgen, 2001).

4.8. Análise estatística

Os resultados foram analisados quanto à sua distribuição pelo teste de normalidade Shapiro-Wilk (Ghasemi & Zahediasl, 2012). Quando comparando dois grupos, aqueles que apresentavam distribuição normal foram analisados pelo teste paramétrico t de Student. Os que não apresentavam distribuição normal foram analisados pelo teste não-paramétrico Mann-Whitney (Callegari-Jaques, 2003). Quando comparando 3 ou mais grupos, foi utilizado o método não-paramétrico Kruskal-Wallis H Test. Os resultados foram considerados significantes para $p < 0,05$.

Para todos os procedimentos estatísticos foi utilizado o programa IBM® SPSS® Statistics – versão 20 (IBM Corp. Released 2011. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. Armonk, NY: IBM Corp.).

5. Resultados

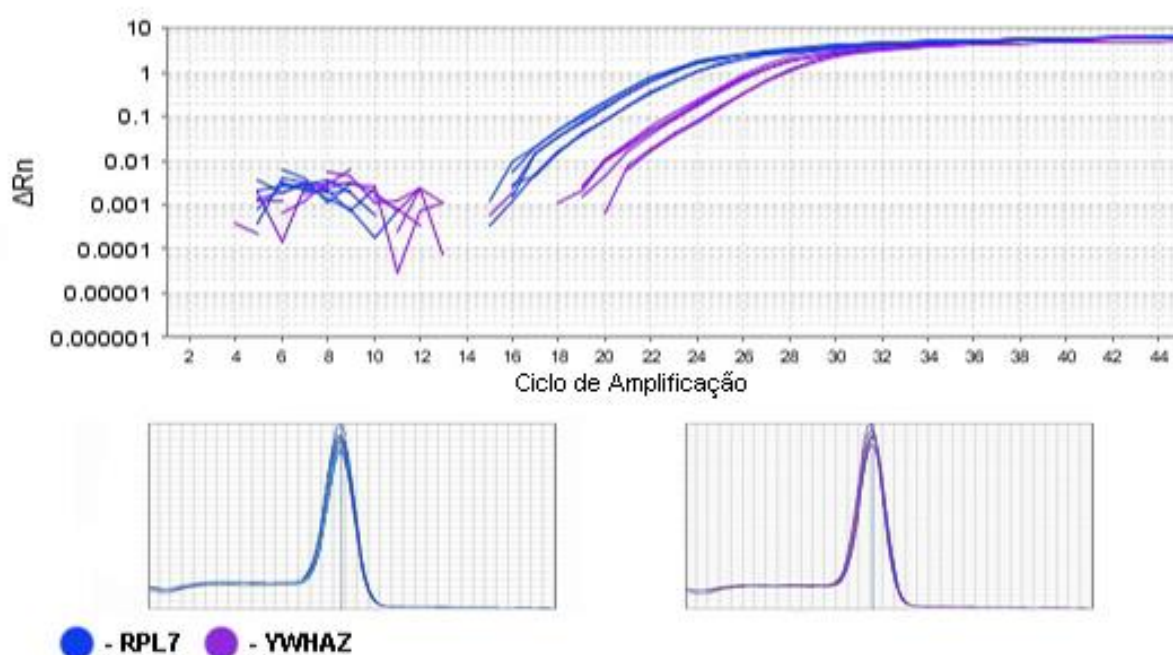
A utilização neste trabalho do pulmão e linfonodo pulmonar deveu-se ao facto do primeiro ser um órgão alvo do CeMV, de grande importância na fisiopatologia do vírus e do segundo ser um órgão central do sistema imunitário. Os resultados obtidos de animais infetados com CeMV não foram contabilizados por serem estatisticamente irrelevantes devido ao reduzido tamanho da amostra e serem de uma espécie diferente (*Stenella coeruleoalba*) da espécie animal do grupo controle (*Delphinus delphis*). Algumas das amostras de pulmão de animais infetados encontravam-se armazenadas a -20°C sem RNA Later (Qiagen, Alemanha), inviabilizando a sua utilização (ANEXO 2).

Os resultados obtidos sobre a expressão das diferentes citocinas estudadas, avaliadas no pulmão e linfonodo pulmonar do grupo controlo estão apresentados de duas formas distintas, conforme o método utilizado para a sua análise. A utilização de dois métodos permitiu o esclarecimento dos pontos fracos e fortes de cada um, servindo como possível referência para estudos posteriores.

5.1. Seleção do gene referência

Foram testados *primers* para os seguintes genes referência: GAPDH; 18S (ANEXO 8), YWHAZ e RPL7 (Tabela 1). Os *primers* para GAPDH e 18S não amplificaram em alguns dos animais. Os *primers* para YWHAZ e RPL7 amplificaram em todos os animais, demonstrando curvas de dissociação únicas. Nas amostras estudadas, o RPL7 apresentava curvas de amplificação mais precoces que o YWHAZ (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Curvas de Amplificação e Dissociação do RPL7 e YWHAZ



5.2. Método do “ $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ”

5.2.1. Eficiências dos Primers

Os *primers* utilizados para avaliar a expressão dos genes RPL7 (Gráfico 2), YWHAZ (Gráfico 3), TNF- α (Gráfico 4), IL-6 (Gráfico 5), IL-4 (Gráfico 6) e IL-10 (Gráfico 7), apresentaram eficiências de 100%, 97%, 91%, 90%, 98% e 97% respectivamente, pelo que permitiam a utilização do método “ $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ”.

As eficiências e sensibilidades dos *primers* da IL-12 e IL-1 β não foram calculadas devido às dificuldades durante o processo de clonagem e limitações de tempo.

Gráfico 2 - Eficiência Primers RPL7

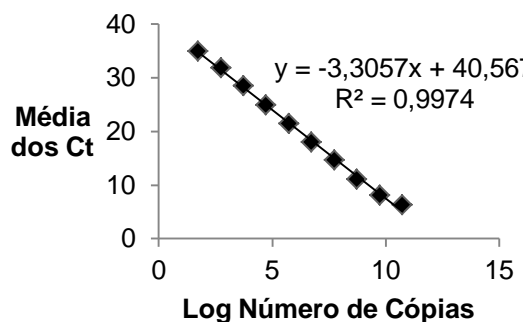


Gráfico 3 - Eficiência Primers YWHAZ

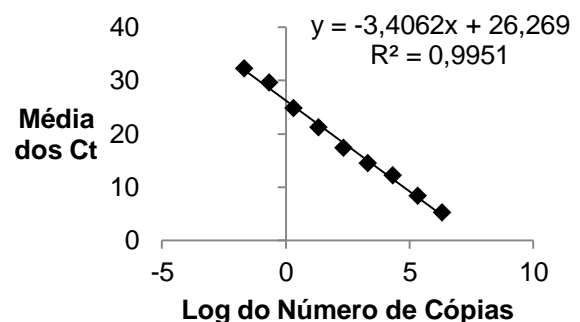


Gráfico 4 - Eficiência Primers TNF- α

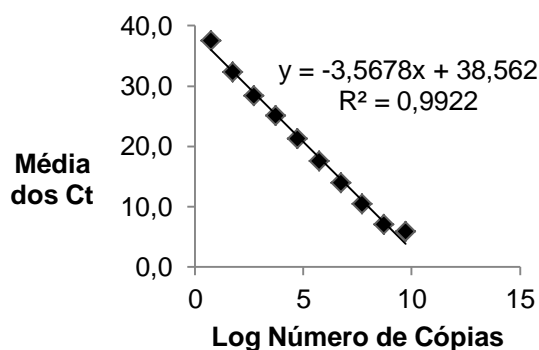


Gráfico 5 - Eficiência Primers IL-6

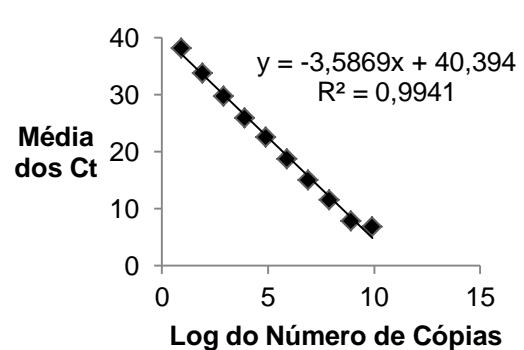


Gráfico 6 - Eficiência Primers IL-4

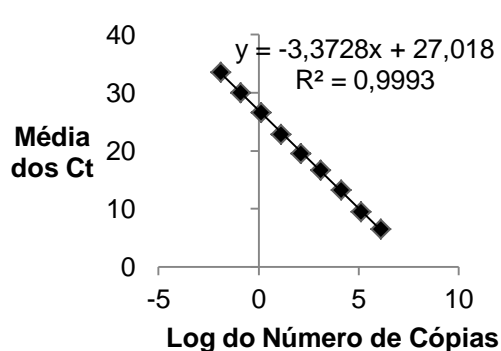
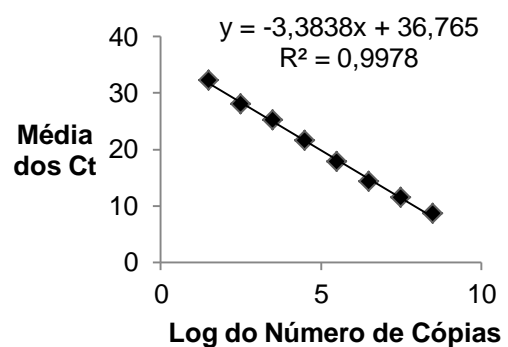


Gráfico 7 - Eficiência Primers IL-10



Legenda: R^2 = Coeficiente de determinação. Os dados encontram-se detalhados no ANEXO 3

5.2.2. Análise de expressão

5.2.2.1. Diferenças de expressão entre citocinas no linfonodo

As diferenças entre a expressão das citocinas no linfonodo foram estatisticamente relevantes ($p=0,00003$). O TNF- α apresentou uma expressão mais elevada que a IL-4 ($p=0,004$), a IL-10 ($p=0,002$) e a IL-6 ($p=0,00028$) (Gráfico 8). A IL-4 e IL-10 apresentaram expressões semelhantes entre si ($p=0,166$) e ambas superiores à de IL-6 ($p=0,003$ e $p=0,007$ respetivamente). A IL-6 apresentou a expressão mais baixa das quatro.

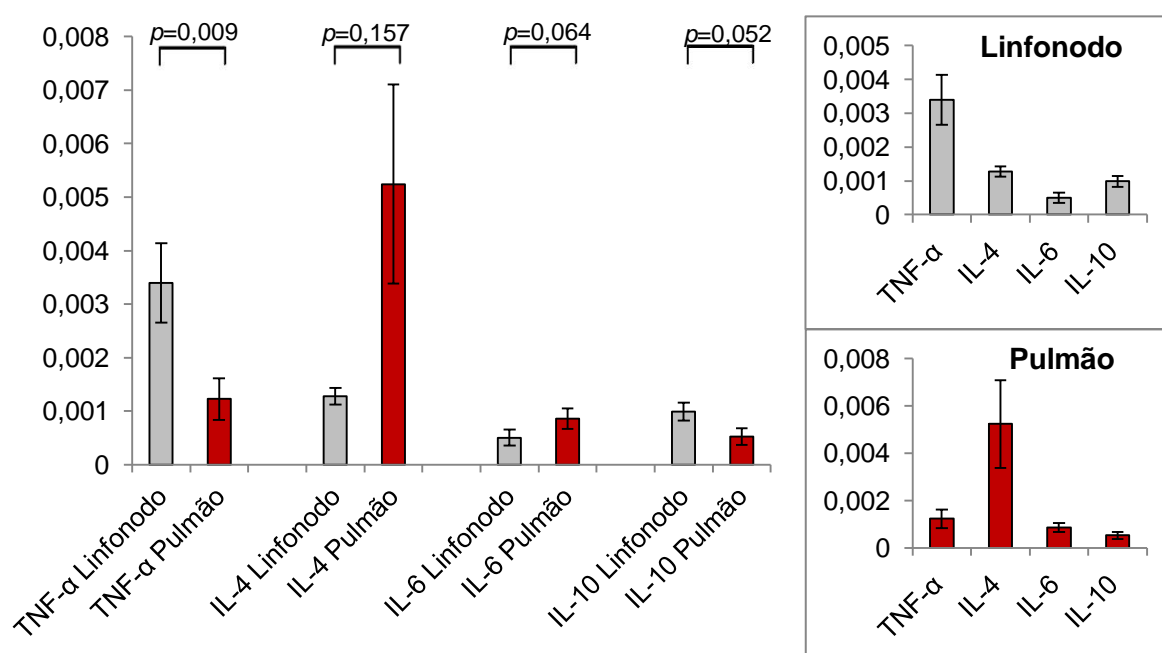
5.2.2.2. Diferenças de expressão entre citocinas no pulmão

As diferenças entre a expressão das citocinas no pulmão foram também estatisticamente relevantes ($p=0,031$), embora com variações entre citocinas. A IL-4 apresentou uma expressão mais elevada que a IL-6 ($p=0,033$) e a IL-10 ($p=0,018$) (Gráfico 8). A IL-6 e IL-10 apresentaram uma expressão semelhante entre si ($p=0,231$). Neste órgão, o TNF- α não apresentou diferenças estatisticamente significativas em comparação com a IL-4 ($p=0,117$), IL-6 ($p=0,413$) ou IL-10 ($p=0,085$).

5.2.2.3. Diferenças de expressão entre Pulmão e Linfonodo

A expressão média relativa de TNF- α no linfonodo pulmonar foi estatisticamente superior ($p=0,009$) à expressão no pulmão. Em relação à IL-4 ($p=0,157$), IL-6 ($p=0,064$) e IL-10 ($p=0,052$), as diferenças de expressão não foram estatisticamente significativas entre os dois órgãos (Gráfico 8).

Gráfico 8 - Expressão média das citocinas nos dois órgãos (método $2^{-\Delta\Delta Ct}$)



Legenda: Os valores das barras correspondem à média das expressões nos diferentes animais e o erro padrão correspondente. Os valores detalhados encontram-se no ANEXO 4. p corresponde ao valor estatístico das diferenças encontradas entre os dois órgãos. A análise da distribuição quanto à normalidade encontra-se no ANEXO 6

5.3. Método do algoritmo “Miner”

5.3.1. Diferenças de expressão entre citocinas no linfonodo

As diferenças entre a expressão das citocinas no linfonodo foram estatisticamente relevantes ($p=0,000001$). A expressão de TNF- α e IL-1 β foi semelhante si ($p=0,224$), superior à de IL-4 ($p=0,001$ e $p=0,01$), IL-6 ($p=0,0001$ e $p=0,0004$), IL-10 ($p=0,0005$ e $p=0,003$) e IL-12 ($p=0,0004$ e $p=0,003$) (Gráfico 9). A expressão de IL-4 e IL-10 foi semelhante entre as duas ($p=0,488$) e superior à de IL-6 ($p=0,013$ e $p=0,015$). A expressão de IL-12 não apresentou diferenças significativas em relação à IL-4 ($p=0,184$), IL-10 ($p=0,644$) e IL-6 ($p=0,149$).

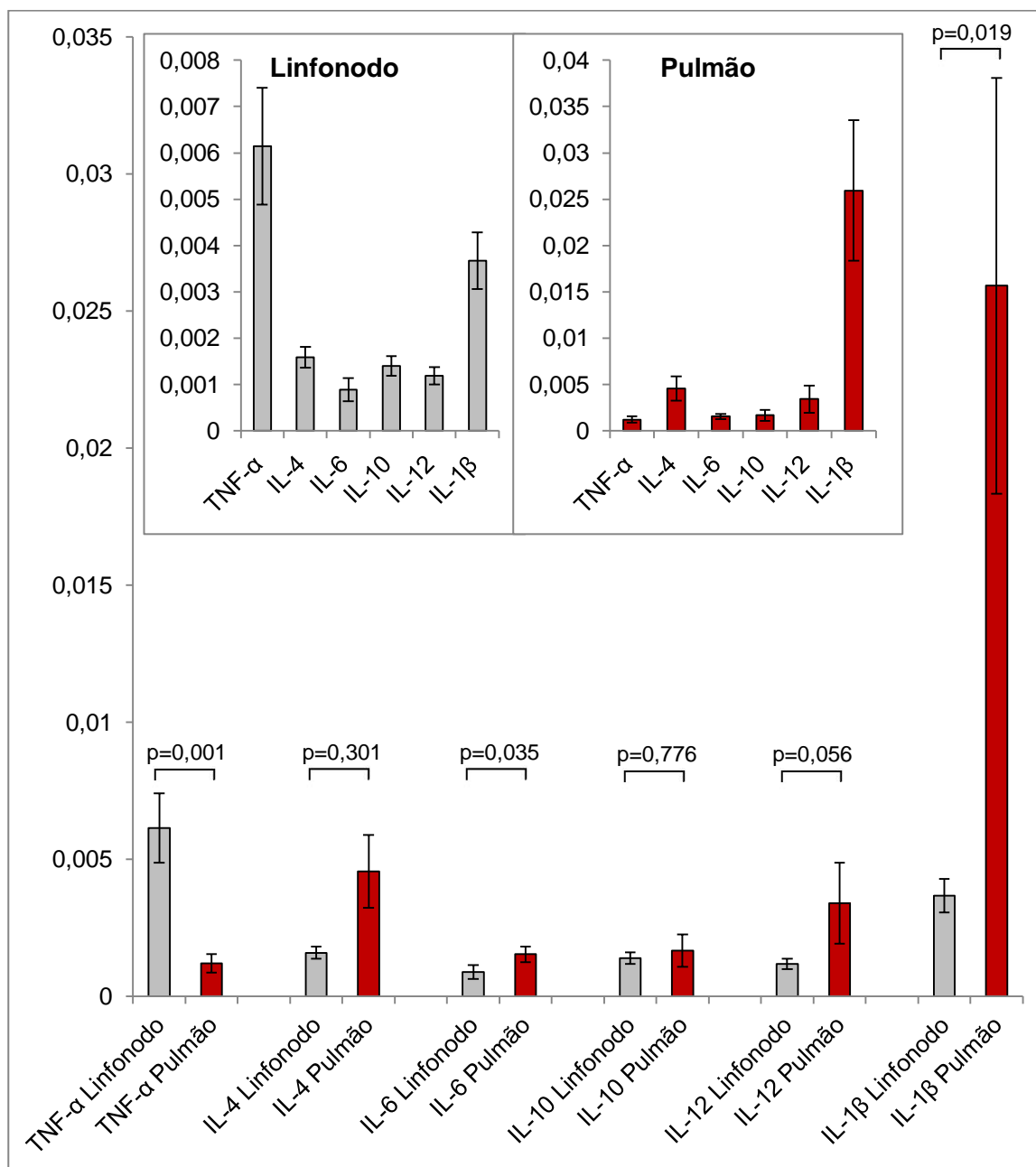
5.3.2. Diferenças de expressão entre citocinas no pulmão

As diferenças entre a expressão das citocinas no pulmão foram estatisticamente relevantes ($p=0,002$), havendo uma expressão mais acentuada de IL-1 β em relação ao TNF- α ($p=0,002$), IL-4 ($p=0,012$), IL-6 ($p=0,0004$), IL-10 ($p=0,002$) e IL-12 ($p=0,007$) (Gráfico 9). Todas as outras citocinas não apresentavam diferenças estatisticamente significativas entre si.

5.3.3. Diferenças de expressão entre Pulmão e Linfonodo

A expressão média relativa de TNF- α ($p=0,001$) no linfonodo pulmonar foi superior à expressa no pulmão, enquanto as expressões médias relativas da IL-6 ($p=0,035$) e da IL-1 β ($p=0,019$) foram inferiores (Gráfico 9). Em relação à IL-4 ($p=0,301$), IL-10 ($p=0,776$) e IL-12 ($p=0,056$) as diferenças de expressão não foram estatisticamente significativas entre os dois órgãos.

Gráfico 9 - Expressão média das citocinas nos dois órgãos (método Miner)



Legenda: Os valores das barras correspondem à média das expressões nos diferentes animais e o erro padrão correspondente. Os valores detalhados encontram-se no ANEXO 5. p corresponde ao valor estatístico das diferenças encontradas entre os dois órgãos. A análise da distribuição quando à normalidade encontra-se no ANEXO 7.

6. Discussão

6.1. Padronização do protocolo experimental

Para se chegar ao protocolo experimental definitivo, houve diversos procedimentos que sofreram alterações, cuja descrição é importante, dado o cariz prospetivo deste trabalho. Dos genes referência testados, apenas o YWHAZ e o RPL7 funcionaram, tendo sido escolhido o último por apresentar curvas de amplificação mais precoces. Os primeiros *primers* para a IL-1 β , IL-10 e IL-12 não funcionaram, tendo sido necessário calcular novos *primers* e otimizar a amplificação dos produtos (ANEXO 8).

A utilização do “método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ” para a análise dos dados seria mais indicada para o objetivo inicial do trabalho, para comparação de um grupo controlo com um grupo de animais infetados com CeMV. Para a análise de dados dentro de cada grupo, o método do “algoritmo Miner” torna-se mais indicado, pois determina a eficiência dos *primers* a partir dos dados de cada ciclo de replicação. Como não foi possível estabelecer um grupo de animais infetados com CeMV, as considerações finais foram tomadas a partir da análise do “algoritmo Miner”, sendo descontinuado o processo de clonagem das citoquinas. Isto levou a que o número de citoquinas analisadas pelo “método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ” fosse inferior. No entanto, os dados obtidos por este método não foram descartados, podendo ter aplicação em estudos futuros.

6.2. Discussão dos Resultados

A criação dum grupo controlo, passível de ser comparado, a partir de animais de vida livre, oriundos de localizações distintas, expostos a diferentes ambientes e capturados acidentalmente em redes de pesca, revelou-se possível, ainda que com algumas limitações.

Os dois órgãos analisados apresentaram resultados bastante diferentes entre si.

No linfonodo pulmonar verificou-se uma distribuição relativamente homogénea dos resultados entre os diversos animais, tendo sido detetado um aumento significativo geral na expressão de TNF- α e IL-1 β em relação às restantes citoquinas, indicativo de inflamação aguda (Tizard, 2009). Tendo em conta que se trata de animais aquáticos de vida livre, expostos a diversos fatores ambientais, essa inflamação pode ser considerada expectável. O facto da IL-6 não se encontrar aumentada sugere um processo inflamatório numa fase inicial (Schindler, et al., 1990c).

No pulmão foi observada uma grande variabilidade de resultados, com uma grande dispersão nos valores da expressão relativa da IL-4, IL-12 e principalmente IL-1 β . Apesar de no Gráfico 9 a expressão média de IL-4 e IL-12 parecer mais elevada que a expressão de TNF, IL-10 e IL-6, o elevado erro padrão faz com que os valores não sejam estatisticamente significativos. Esta expressão aumentada pontual de duas interleucinas responsáveis por dois tipos de resposta diferentes pode dever-se a processos inflamatórios distintos nos diferentes animais, uma vez que se tratam de órgãos expostos a agressões do exterior

(Huaux, Liu, McGarry, Ullenbruch, & Phan, 2003; Manetti, et al., 1993). A elevada expressão de IL-1 β também é sugestiva de um processo inflamatório. No entanto, a expressão relativa das outras citocinas pro-inflamatórias (TNF- α e IL-6) revelou-se baixa, não coincidindo com o que seria de esperar num processo inflamatório agudo. Todas estas variações nas expressões das citocinas no pulmão sugerem a presença de diferentes processos inflamatórios, distintos de animal para animal, coincidindo com as alterações observadas nas necropsias, que incluíram a observação de material granuloso, hepatização, zonas de pneumonia, hemorragias e petéquias.

Este aumento de citocinas pro-inflamatórias contrasta com o esperado em animais capturados, uma vez que os níveis de cortisol associados ao *stress* de captura, ao aumentarem, levam ao decréscimo da expressão destas citocinas e ao aumento de citocinas imunossupressoras como a IL-10 (Fonfara, Siebert, Prange, & Colijn, 2007). No entanto, o tempo que leva da captura accidental à morte do animal pode não ser o suficiente para que essas alterações sejam detetadas. Quando comparando os dois órgãos, o aumento de expressão de TNF- α no linfonodo pulmonar em relação ao pulmão e o aumento de expressão da IL-1 β e IL-6 no pulmão em relação ao linfonodo pulmonar são sugestivos de duas fases distintas de inflamação nos dois órgãos: nos pulmões foram encontrados perfis de expressão característicos com inflamação aguda já estabelecida e a progredir para a cronicidade e resposta secundária (Farrar & Hliffiker, 1982; Manetti, et al., 1993; Kidd, 2003); enquanto nos linfonodos foram detetados sinais de inflamação aguda numa fase inicial (Akira, Hirano, Taga, & Kishimoto, 1990; Tizard, 2009). Esta diferença de perfis de expressão entre os dois órgãos é expectável, pois enquanto os pulmões, como órgãos que se encontram expostos a agressões do ambiente, são os primeiros a sofrer alterações, os linfonodos só são afetados quando as alterações progridem.

A grande variabilidade da expressão de diversas citocinas nos pulmões entre os diversos animais em estudo e a incoerência de alguns valores obtidos não permitiram a criação de um grupo controlo homogéneo para este órgão. Esta variabilidade de respostas pode dever-se às alterações pontuais detetadas nos pulmões, que inicialmente possam ter sido consideradas como causadas pela captura dos animais, tendo em conta o seu estatuto de animais de vida livre, contendo baixa carga parasitária e sendo negativos a doenças virais sendo considerados saudáveis. Por outro lado, a grande homogeneidade nos perfis de expressão das citocinas nos linfonodos pulmonares, a coerência com as alterações observadas na necropsia e o tipo de perfil observado levam a considerar o linfonodo pulmonar como apto, tendo sido estabelecido um grupo controlo efetivo, a partir do qual é possível realizar estudos comparativos com animais infetados.

As diferenças encontradas nos perfis de expressão entre os dois órgãos serviram também como estudo comparativo entre duas amostras diferentes, comprovando a utilidade e eficácia deste método.

7. Conclusão

Este trabalho experimental foi feito de raiz, tendo havido a necessidade de várias afinações e alterações de procedimentos, culminando num protocolo experimental eficaz para a obtenção de perfis de expressão de citocinas em amostras de mamíferos marinhos capturados acidentalmente em redes de pesca.

Foi feito um contributo para a elaboração dum grupo controlo homogéneo a partir de animais oriundos de localizações distintas e expostos a diferentes agressões ambientais. No entanto, isto apenas foi possível em amostras de linfonodo pulmonar e não em amostras de pulmão. A criação dum grupo controlo vai permitir que, num futuro próximo, sejam feitos estudos comparativos entre animais saudáveis e animais infetados com agentes patogénicos de importância para saúde pública e ambiental, dada a qualidade de animais sentinelas dos golfinhos e, a partir dos resultados obtidos, será possível determinar quais os elementos do sistema imunitário em ação, aprofundando os conhecimentos sobre fisiopatologia do agente envolvido. O facto de ter sido feito em amostras de animais mortos por captura acidental, permitiu contornar problemas de ética relacionados com a manipulação de animais vivos, sem interferência na qualidade dos resultados.

Apesar de ter sido dado o primeiro passo, não foi possível fazer o estudo comparativo com animais infetados com morbilivirus devido ao reduzido número de amostras de linfonodo pulmonar e devido à incapacidade de utilização de amostras de pulmão.

Para que este estudo seja significativo, é necessário dar-lhe continuidade e insistir no aprofundamento dos conhecimentos nesta área da saúde animal e ambiental, da qual ainda existe pouca informação.

Bibliografia

- Abdel-Salam, B. K. (2010). Comparing effects of interleukin-2 and interleukin-4 on the expression of MHC class II, CD80 and CD86 on polymorphonuclear neutrophils. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, 11, 115-120.
- Abed, N. S., Chace, J. H., & Cowdery, J. S. (1994). T cell-independent and T cell-dependent B cell activation increases IFN γ expression and renders B cells sensitive to IFN γ -mediated inhibition. *The Journal of Immunology*, 153, 3369-3377.
- Abed, N. S., Chace, J. H., Fleming, A. L., & Cowdery, J. S. (1994). Interferon-gamma regulation of B lymphocyte differentiation: activation of B cells is a prerequisite for IFN-gamma-mediated inhibition of B cell differentiation. *Cellular Immunology*, 153, 356-366.
- Acosta Rodriguez, E. V., Zuñiga, E., Montes, C. L., & Gruppi, A. (2003). Interleukin-4 biases differentiation of B cells from Trypanosoma cruzi-infected mice and restrains their fratricide: role of Fas ligand down-regulation and MHC class II-transactivator up-regulation. *Journal of leukocyte biology*, 73, 127-136.
- Adams, R. B., Planchon, S. M., & Roche, J. K. (1993). IFN-gamma modulation of epithelial barrier function. Time course, reversibility, and site of cytokine binding. *The Journal of Immunology*, 150, 2356-2363.
- Aderka, D., Le, J. M., & Vilcek, J. (1989). IL-6 inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor production in cultured human monocytes, U937 cells, and in mice. *The Journal of Immunology*, 143, 3517-3523.
- Aggarwal, B. B., Samanta, A., & Feldmann, M. (2000). TNF Receptors. In M. Feldmann, S. Durum, T. Hirano, J. Vilcek, N. Nicola, & J. J. Oppenheim, *Cytokine Reference: A Compendium of Cytokines and Other Mediators of Host* (pp. 1619-1632). Waltham: Academic Press.
- Aggarwal, B. B., Samanta, A., & Feldmann, M. (2000). TNF α . In M. Feldmann, S. Durum, T. Hirano, J. Vilcek, N. Nicola, & J. J. Oppenheim, *Cytokine Reference: A Compendium of Cytokines and Other Mediators of Host Defense* (pp. 413-434). Waltham: Academic Press.
- Aguilar-Santelises, M., Magnusson, R., Svenson, S. B., Loftenius, A., Andersson, B., Mellstedt, H., & Jondal, M. (1991). Expression of interleukin-1 α , interleukin-1 β and interleukin-6 in chronic B lymphocytic leukaemia (B-CLL) cells from patients at different stages of disease progression. *Clinical & Experimental Immunology*, 84, 422-428.
- Akbar, S. M., Inaba, K., & Onji, M. (1996). Upregulation of MHC class II antigen on dendritic cells from hepatitis B virus transgenic mice by interferon-gamma: abrogation of immune response defect to a T-cell-dependent antigen. *Immunology*, 87, 519-527.
- Akira, S., Hirano, T., Taga, T., & Kishimoto, T. (1990). Biology of multifunctional cytokines: IL 6 and related molecules (IL 1 and TNF). *The FASEB Journal*, 4, 2860-2867.
- Alderson, M. R., Armitage, R. J., Tough, T. W., Strockbine, L., Fanslow, W. C., & Spriggs, M. K. (1993). CD40 expression by human monocytes: regulation by cytokines and activation of monocytes by the ligand for CD40. *The Journal of Experimental Medicine*, 178, 669-674.
- Aman, M. J., Tretter, T., Eisenbeis, I., Bug, G., Decker, T., Aulitzky, W. E., . . . Peschel, C. (1996). Interferon-alpha stimulates production of interleukin-10 in activated CD4 $^{+}$ T cells and monocytes. *Blood*, 87, 4731-4736.
- Amento, E. P., Bhan, A. K., McCullagh, K. G., & Krane, S. M. (1985). Influence of gamma interferon on synovial fibroblast-like cells: Ia induction and inhibition of collagen synthesis. *The Journal of Clinical Investigation*, 76, 836-848.
- Arenzana-Seisdedos, F., Virelizier, J. L., & Fiers, W. (1985). Interferons as macrophage activating factors: III. Preferential effects of interferon-gamma on the interleukin-1 secretory potential of fresh or aged human monocytes. *The Journal of Immunology*, 134, 2444-2448.
- Arock, M., Zuany-Amorim, C., Singer, M., Benhamou, M., & Pretolani, M. (1996). Interleukin-10 inhibits cytokine generation from mast cells. *European Journal of Immunology*, 26, 166-170.

- Asakawa, H., Hanafusa, T., Kobayashi, T., Takai, S., Kono, N., & Tarui, S. (1992). Interferon-gamma reduces the thyroid peroxidase content of cultured human thyrocytes and inhibits its increase induced by thyrotropin. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 74, 1331-1335.
- Aste-Amezaga, M., D'Andrea, A., Kubin, M., & Trinchieri, G. (1994). Cooperation of natural killer cell stimulatory factor/interleukin-12 with other stimuli in the induction of cytokines and cytotoxic cell-associated molecules in human T and NK cells. *Cell Immunology*, 156, 480-492.
- Ayala, A., Chung, C., Song, G. Y., & Chaudry, I. H. (2001). IL-10 mediation of activation-induced Th1 cell apoptosis and lymphoid dysfunction in poly microbial sepsis. *Cytokine*, 14, 37-48.
- Bachmann, M. F., Wolint, P., Walton, S., Schwarz, K., & Oxenius, A. (2007). Differential role of IL-2R signaling for CD8+ T cell responses in acute and chronic viral infections. *European Journal of Immunology*, 37, 1502-1512.
- Bachwich, P. R., Chensue, S. W., Larrick, J. W., & Kunkel, S. L. (1986). Tumor necrosis factor stimulates interleukin-1 and prostaglandin E2 production in resting macrophages. *Biochemical and biophysical research communications*, 94-101, 136.
- Bagley, C. J., Tavernier, J., Woodcock, J. M., & Lopez, A. F. (2000). IL-5 Receptor. In M. Feldmann, S. Durham, T. Hirano, J. Vilcek, N. Nicola, & J. J. Oppenheim, *Cytokine Reference: A Compendium of Cytokines and Other Mediators of Host Defense* (pp. 1903-1911). Waltham: Academic Press.
- Barata, L. T., Ying, S., Meng, Q., Barkans, J., Rajakulasingam, K., Durham, S. R., & Kay, A. B. (1998). IL-4- and IL-5-positive T lymphocytes, eosinophils, and mast cells in allergen-induced late-phase cutaneous reactions in atopic subjects. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 101, 222-230.
- Barsacchi, R., Perrotta, C., Bulotta, S., Moncada, S., Borgese, N., & Clementi, E. (2003). Activation of endothelial nitric-oxide synthase by tumor necrosis factor- α : a novel pathway involving sequential activation of neutral sphingomyelinase, phosphatidylinositol-3' kinase, and Akt. *Molecular pharmacology*, 63, 886-895.
- Baumann, H., & Gauldie, J. (1990). Regulation of hepatic acute phase plasma protein genes by hepatocyte stimulating factors and other mediators of inflammation. *Molecular biology & medicine*, 7, 147-159.
- Beineke, A., Siebert, U., Wohlsein, P., & Baumgärtner, W. (2010). Immunology of whales and dolphins. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 81-94.
- Bellinghausen, I., Brand, P., Böttcher, I., Klostermann, B., Knop, J., & Saloga, J. (2003). Production of interleukin-13 by human dendritic cells after stimulation with protein allergens is a key factor for induction of T helper 2 cytokines and is associated with activation of signal transducer and activator of transcription-6. *Immunology*, 108, 167-176.
- Bendtsen, K., Buschard, K., Diamant, M., Horn, T., & Svenson, M. (1989). Possible role of IL-1, TNF- α , and IL-6 in insulin-dependent diabetes mellitus and autoimmune thyroid disease. *Lymphokine*, 8, 335-340.
- Bennett, W. A., Lagoo-Deenadayan, S., Whitworth, N. S., Brackin, M. N., Hale, E., & Cowan, B. D. (1997). Expression and production of interleukin-10 by human trophoblast: relationship to pregnancy immunotolerance. *Early pregnancy: biology and medicine: the official journal of the Society for the Investigation of Early Pregnancy*, 3, 190-198.
- Berkman, N., John, M., Roesems, G., Jose, P. J., Barnes, P. J., & Chung, K. F. (1995). Inhibition of macrophage inflammatory protein-1 α expression by IL-10. Differential sensitivities in human blood monocytes and alveolar macrophages. *The Journal of Immunology*, 155, 4412-4418.
- Bethea, J. R., Gillespie, G. Y., & Benveniste, E. N. (1992). Interleukin-1 β induction of TNF- α gene expression: Involvement of protein kinase C. *Journal of Cellular Physiology*, 152, 264-273.
- Billiau, A., & Matthys, P. (1992). Interferon-gamma, more of a cachectin than tumor necrosis factor. *Cytokine*, 4, 259-263.

- Billiau, A., & Vandenbroeck, K. (2000). IFN γ . In M. Feldmann, S. Durum, T. Hirano, J. Vilcek, N. Nicola, & J. J. Oppenheim, *Cytokine Reference: A Compendium of Cytokines and Other Mediators of Host Defense* (pp. 642-688). Waltham: Academic Press.
- Bischoff, S. C., Brunner, T., De Weck, A. L., & Dahinden, C. A. (1990). Interleukin 5 modifies histamine release and leukotriene generation by human basophils in response to diverse agonists. *The Journal of experimental medicine*, 172, 1577-1582.
- Biswas, P., Delfanti, F., Bernasconi, S., Mengozzi, M., Cota, M., Polentarutti, N., . . . Poli, G. (1998). Interleukin-6 induces monocyte chemotactic protein-1 in peripheral blood mononuclear cells and in the U937 cell line. *Blood*, 91, 258-265.
- Black, R. A., Kronheim, S. R., Cantrell, M., Deeley, M. C., March, C. J., Prickett, K. S., . . . Mochizuki, D. Y. (1988). Generation of biologically active interleukin-1 β by proteolytic cleavage of the inactive precursor. *The Journal of Biological Chemistry*, 263, 9437-9442.
- Bluthé, R. M., Dantzer, R., & Kelley, K. W. (1991). Interleukin-1 mediates behavioural but not metabolic effects of tumor necrosis factor alpha in mice. *European Journal of Pharmacology*, 209, 281-283.
- Bonder, C. S., Finlay-Jones, J. J., & Hart, P. H. (1999). Interleukin-4 regulation of human monocyte and macrophage interleukin-10 and interleukin-12 production. Role of a functional interleukin-2 receptor gamma-chain. *Immunology*, 96, 529-536.
- Bonfield, T. L., Konstan, M. W., Burfeind, P., Panuska, J. R., Hilliard, J. B., & Berger, M. (1995). Normal bronchial epithelial cells constitutively produce the anti-inflammatory cytokine interleukin-10, which is downregulated in cystic fibrosis. *American Journal of respiratory cell and molecular biology*, 13, 257-261.
- Bossart, G. D. (2011). Marine Mammals as Sentinel Species for Oceans and Human Health. *Veterinary Pathology, Volume 48, Issue 2*, 676-690.
- Boyman, O., Cho, J.-H., & Sprent, J. (2010). The Role of Interleukin-2 in Memory CD8 Cell Differentiation. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 684, 28-41.
- Bradding, P., Feather, I. H., Howarth, P. H., Mueller, R., Roberts, J. A., Britten, K., . . . Holgate, S. T. (1992). Interleukin 4 is localized to and released by human mast cells. *The Journal of experimental medicine*, 176, 1381-1386.
- Buckman, A., Veldhoen, N., Ellis, G., Ford, J. K., Helbing, C. C., & Ross, P. S. (2011). PCB-Associated Changes in mRNA Expression in Killer Whales (*Orcinus orca*) from the NE Pacific Ocean. *Environmental Science & Technology*, 45, 10194-10202.
- Buelens, C., Willems, F., Delvaux, A., Piérard, G., Delville, J. P., Velu, T., & Goldman, M. (1995). Interleukin-10 differentially regulates B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) expression on human peripheral blood dendritic cells. *European Journal of Immunology*, 25, 2668-2672.
- Burd, P. R., Rogers, H. W., Gordon, J. R., Martin, C. A., Jayaraman, S., Wilson, S. D., . . . Dorf, M. E. (1989). Interleukin 3-dependent and -independent mast cells stimulated with IgE and antigen express multiples cytokines. *The Journal of Experimental Medicine*, 170, 245-257.
- Burd, P. R., Thompson, W. C., Max, E. E., & Mills, F. C. (1995). Activated mast cells produce interleukin 13. *The Journal of experimental medicine*, 181, 1373-1380.
- Büttner, C., Skupin, A., Reimann, T., Rieber, E. P., Unteregger, G., Geyer, P., & Frank, K.-H. (1997). Local production of interleukin-4 during radiation-induced pneumonitis and pulmonary fibrosis in rats: macrophages as a prominent source of interleukin-4. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 17, 315-325.
- Caliguri, M. A., Zmuidzinas, A., Manley, T. J., Levine, H., Smith, K. A., & Ritz, J. (1990). Functional consequences of interleukin 2 receptor expression on resting human lymphocytes: Identification of a novel natural killer cell subset with high affinity receptors. *The Journal of experimental medicine*, 171, 1509-1526.
- Callegari-Jaques, S. M. (2003). *Biostatística: Princípios e Aplicações*. São Paulo: Artmed.
- Capsoni, F., Minonzio, F., Ongari, A. M., Carbonelli, V., Galli, A., & Zanussi, C. (1995). IL-10 up-regulates human monocyte phagocytosis in the presence of IL-4 and IFN-gamma. *Journal of leukocyte biology*, 58, 351-358.

- Carter, N. A., Rosser, E. C., & Mauri, C. (2012). Interleukin-10 produced by B cells is crucial for the suppression of Th17/Th1 responses, induction of T regulatory type 1 cells and reduction of collagen-induced arthritis. *Arthritis Research & Therapy*, 14, R32.
- Cassatella, M. A., Meda, L., Bonora, S., Ceska, M., & Constantin, G. (1993). Interleukin 10 (IL-10) inhibits the release of proinflammatory cytokines from human polymorphonuclear leukocytes. Evidence for an autocrine role of tumor necrosis factor and IL-1 beta in mediating the production of IL-8 triggered by lipopolysaccharide. *The Journal of experimental medicine*, 178, 2207-2211.
- Cassatella, M. A., Meda, L., Gasperini, S., D'Andrea, A., Ma, X., & Trinchieri, G. (1995). Interleukin-12 production by human polymorphonuclear leukocytes. *European Journal of Immunology*, 25, 1-5.
- Castell, J. V., Gómez-Lechón, M. J., David, M., Hirano, T., Kishimoto, T., & Heinrich, P. C. (1988). Recombinant human interleukin-6 (IL-6/BSF-2/HSF) regulates the synthesis of acute phase proteins in human hepatocytes. *FEBS Letters*, 232, 347-350.
- Chabot, S., Williams, G., Hamilton, M., Sutherland, G., & Yong, V. W. (1999). Mechanisms of IL-10 production in human microglia-T cell interaction. *The Journal of Immunology*, 162, 6819-6828.
- Chan, C. Y., St. John, A. L., & Abraham, S. N. (2013). Mast Cell Interleukin-10 Drives Localized Tolerance in Chronic Bladder Infection. *Immunity*, 349-359.
- Chan, S. H., Perussia, B., Gupta, J. W., Kobayashi, M., Pospisil, M., Young, H. A., . . . Trinchieri, G. (1991). Induction of interferon gamma production by natural killer cell stimulatory factor: characterization of the responder cells and synergy with other inducers. *The Journal of experimental medicine*, 173, 869-879.
- Chang, W. L., Baumgarth, N., Yu, D., & Barry, P. A. (2004). Human cytomegalovirus-encoded interleukin-10 homolog inhibits maturation of dendritic cells and alters their functionality. *Journal of Virology*, 78, 8720-8731.
- Chaudhry, A., Samstein, R. M., Treuting, P., Liang, Y., Pils, M. C., Heinrich, J.-M., . . . Rudensky, A. (2011). Interleukin-10 signaling in regulatory T cells is required for suppression of Th17 cell-mediated inflammation. *Immunity*, 34, 566-578.
- Chaves, M. M., Silvestrini, A. A., Silva-Teixeira, D. N., & Nogueira-Machado, J. A. (1996). Effect in vitro of gamma interferon and interleukin-10 on generation of oxidizing species by human granulocytes. *Inflammation Research*, 45, 313-315.
- Chen, W.-F., & Zlotnik, A. (1991). IL-10: a novel cytotoxic T cell differentiation factor. *The Journal of Immunology*, 147, 528-534.
- Chensue, S. W., Warmington, K. S., Ruth, J. H., Sangi, P. S., Lincoln, P., & Kunkel, S. L. (1996). Role of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in TH1 (mycobacterial) and TH2 (schistosomal) antigen-induced granuloma formation: relationship to local inflammation, Th cell expression and IL-12 production. *The Journal of Immunology*, 157, 4602-4608.
- Chomarat, P., Rissoan, M., Banchereau, J., & Miossec, P. (1993). Interferon gamma inhibits interleukin 10 production by monocytes. *The Journal of Experimental Medicine*, 177, 523-527.
- Chrousos, G. P. (1995). The Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis and Immune-Mediated Inflammation. *The New England Journal of Medicine*, 332, 1351-1362.
- Coeshott, C., Ohnemus, C., Pilyavskaya, A., Ross, S., Wieczorek, M., Kroona, H., . . . Cheronis, J. (1999). Converting enzyme-independent release of TNF α and IL-1 β from stimulated human monocytic cell line in the presence of activated neutrophils or purified proteinase-3. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96, 6261-6266.
- Collins, H. L., & Bancroft, G. J. (1992). Cytokine enhancement of complement-dependent phagocytosis by macrophages: synergy of tumor necrosis factor-alpha and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for phagocytosis of *Cryptococcus neoformans*. *European journal of immunology*, 22, 1447-1454.
- Colotta, F., Re, F., Muzio, M., Polentarutti, N., Minty, A., Caput, D., . . . Mantovani, A. (1994). Interleukin-13 induces expression and release of interleukin-1 decoy receptor in human polymorphonuclear cells. *The Journal of biological chemistry*, 269, 12403-12406.

- Comissão Europeia. (20 de Dezembro de 2005). *A Comissão dá início a procedimentos contra oito Estados-Membros, com base na insuficiente protecção das baleias, golfinhos e botos*. Obtido de European Commission Press Release Database: http://europa.eu/rapid/press-release_IP-05-1641_pt.htm
- Conti, P., Dempsey, R. A., Reale, M., Barbacane, R. C., Panara, M. R., Bongrazio, M., & Mier, J. W. (1991). Activation of human natural killer cells by lipopolysaccharide and generation of interleukin-1 alpha, beta, tumour necrosis factor and interleukin-6. Effect of IL-1 receptor antagonist. *Immunology*, 73, 450-456.
- Corrigan, C. J., Haczku, A., Gemou-Engesaeth, V., Doi, S., Kikuchi, Y., Takatsu, K., . . . Kay, A. B. (1993). CD4 T-lymphocyte activation in asthma is accompanied by increased serum concentrations of interleukin-5. Effect of glucocorticoid therapy. *The American review of respiratory disease*, 147, 540-547.
- Coughlin, C. M., Salhany, K. E., Wysocka, M., Aruga, E., Kurzawa, H., Chang, A. E., . . . Lee, W. M. (1998). Interleukin-12 and interleukin-18 synergistically induce murine tumor regression which involves inhibition of angiogenesis. *The Journal of Clinical Investigation*, 101, 1441-1452.
- Cousens, L. P., Orange, J. S., & Biron, C. A. (1995). Endogenous IL-2 contributes to T cell expansion and IFN-gamma production during lymphocytic choriomeningitis virus infection. *The Journal of Immunology*, 155, 5690-5699.
- Cox, G. (1996). IL-10 enhances resolution of pulmonary inflammation in vivo by promoting apoptosis of neutrophils. *The American Journal of Physiology*, 271, L566-L571.
- Cray, C., Zaias, J., & Altman, N. H. (2009). Acute Phase Response in Animals: A Review. *Comparative Medicine*, 59, 517-526.
- Cunha, F. Q., Moncada, S., & Liew, F. Y. (1992). Interleukin-10 (IL-10) inhibits the induction of nitric oxide synthase by interferon-gamma in murine macrophages. *Biochemical and biophysical research communications*, 182, 1155-1159.
- D'Ambrosio, D., Cippitelli, M., Cocciolo, M. G., Mazzeo, D., Di Lucia, P., Lang, R., . . . Panina-Bordignon, P. (1998). Inhibition of IL-12 production by 1,25-dihydroxyvitamin D3. Involvement of NF-kappaB downregulation in transcriptional repression of the p40 gene. *The Journal of clinical investigation*, 101, 252-262.
- D'Andrea, A., Aste-Amezaga, M., Valiante, N. M., Ma, X., Kubin, M., & Trinchieri, G. (1993). Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *The Journal of experimental medicine*, 178, 1041-1048.
- D'Andrea, A., Ma, X., Aste-Amezaga, M., Paganin, C., & Trinchieri, G. (1995). Stimulatory and Inhibitory Effects of Interleukin (IL)-4 and IL-13 on the Production of Cytokines By Human Peripheral-Blood Mononuclear-Cells - Priming for IL-12 and Tumor-Necrosis-Factor-Alpha Production. *Journal of Experimental Medicine*, 181, 537 - 546.
- D'Andrea, A., Rengaraju, M., Valiante, N. M., Chehimi, J., Kubin, M., Aste, M., . . . Trinchieri, G. (1992). Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 176, 1387-1398.
- Davis, A. M., Ramos, H., Matthews, L. A., & Farrar, J. D. (2008). Variegation of CD4+ T cell phenotypes is regulated by IL-12 and IFN-alpha. *The FASEB Journal*, 22, 845.5.
- de Waal Malefyt, R. (2000). IL-10. In M. Feldmann, S. Durum, T. Hirano, J. Vilcek, N. Nicola, & J. J. Oppenheim, *Cytokine Reference: A Compendium of Cytokines and Other Mediators of Host Defense* (pp. 165-185). Waltham: Academic Press.
- de Waal Malefyt, R., Abrams, J., Bennett, B., Figdor, C. G., & de Vries, J. E. (1991). Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *The Journal of Experimental Medicine*, 174, 1209-1220.
- de Waal Malefyt, R., Abrams, J., Zurawski, S., Lecron, J., Mohan-Peterson, S., Sanjanwala, B., . . . Yssel, H. (1995). Differential regulation of IL-13 and IL-4 production by human CD8+ and CD4+ Th0, Th1 and Th2 cell clones and EBV-transformed B-cells. *International Immunology*, 7, 1405-1416.
- de Waal Malefyt, R., Figdor, C. G., Huijbens, R., Mohan-Peterson, S., Bennett, B., Culpepper, J., . . . de Vries, J. E. (1993a). Effects of IL-13 on phenotype, cytokine

- production, and cytotoxic function of human monocytes. Comparison with IL-4 and modulation by IFN-gamma or IL-10. *The Journal of Immunology*, 151, 6370-6381.
- de Waal Malefyt, R., Yssel, H., & de Vries, J. E. (1993b). Direct effects of IL-10 on subsets of human CD4⁺ T cell clones and resting T cells. Specific inhibition of IL-2 production and proliferation. *The Journal of Immunology*, 150, 4754-4765.
- Debets, J. M., Ruers, T. J., van der Linden, M. P., van der Linden, C. J., & Buurman, W. A. (1989). Inhibitory effect of corticosteroids on the secretion of tumour necrosis factor (TNF) by monocytes is dependent on the stimulus inducing TNF synthesis. *Clinical & Experimental Immunology*, 78, 224-229.
- Decreto-Lei nº 263/81 de 3 de Setembro, nº 202 - I série (Secretaria de Estado do Ordenamento e Ambiente, Ministério da Qualidade de Vida).
- Delgado, M., & Ganea, D. (1999). Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit interleukin-12 transcription by regulating nuclear factor kB and Ets activation. *The Journal of Biological Chemistry*, 274, 31930-31940.
- Delgado, M., Munoz-Elias, E. J., Gomariz, R. P., & Ganea, D. (1999). Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide enhance IL-10 production by murine macrophages: in vitro and in vivo studies. *The Journal of Immunology*, 162, 1707-1716.
- Denburg, J. A., Silver, J. E., & Abrams, J. S. (1991). Interleukin-5 is a human basophilopoietin: induction of histamine content and basophilic differentiation of HL-60 cells and of peripheral blood basophil-eosinophil progenitors. *Blood*, 77, 1462-1468.
- Denis, F., & Archambault, D. (2001). Molecular cloning and characterization of beluga whale (*Delphinapterus leucas*) interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha. *Canadian journal of veterinary research*, 65, 233-240.
- Dickensheets, H. L., Freeman, S. L., Smith, M. F., & Donnelly, R. P. (1997). Interleukin-10 upregulates tumor necrosis factor receptor type-II (p75) gene expression in endotoxin-stimulated human monocytes. *Blood*, 90, 4162-4171.
- Dinarello, C. A. (2000). IL-1 β . In M. Feldmann, S. Durum, T. Hirano, J. Vilcek, N. Nicola, & J. J. Oppenheim, *Cytokine Reference: A Compendium of Cytokines and Other Mediators of Host Defense* (pp. 351-374). Waltham: Academic Press.
- Ding, A., Nathan, C. F., Graycar, J., Derynck, R., Stuehr, D. J., & Srinivasan, S. (1990). Macrophage deactivating factor and transforming growth factor-beta1, -beta2 and -beta3 inhibit induction of macrophage nitrogen oxide synthesis by IFN-gamma. *The Journal of Immunology*, 145, 940-944.
- Doherty, T. M., Kastelein, R., Menon, S., Andrade, S., & Coffman, R. L. (1993). Modulation of murine macrophage function by IL-13. *The Journal of Immunology*, 151, 7151-7160.
- Dooms, H., Wolslegel, K., Lin, P., & Abbas, A. K. (2007). Interleukin-2 enhances CD4⁺ T cell memory by promoting the generation of IL-7R alpha-expressing cells. *The Journal of experimental medicine*, 204, 547-557.
- Dubois, B., Massacrier, C., Vanbervliet, B., Fayette, J., Briere, F., Banchereau, J., & Caux, C. (1998). Critical role of IL-12 in dendritic cell-induced differentiation of naive B lymphocytes. *The Journal of Immunology*, 161, 2223-2231.
- Dummer, W., Bastian, B. C., Ernst, N., Schanzle, C., Schwaaf, A., & Bröcker, E.-B. (1996). Interleukin-10 production in malignant melanoma: Preferential detection of IL-10-secreting tumor cells in metastatic lesions. *International Journal of Cancer*, 66, 607-610.
- Dustin, M. L., Singer, K. H., Tuck, D. T., & Springer, T. A. (1988). Adhesion of the T lymphoblasts to epidermal keratinocytes is regulated by interferon gamma and is mediated by intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1). *The Journal of Experimental Medicine*, 167, 1323-1340.
- Ek, M., Kurosawa, M., Lundeberg, T., & Ericsson, A. (1998). Activation of vagal afferents after intravenous injection of interleukin-1beta: role of endogenous prostaglandins. *The Journal of neuroscience*, 18, 9471-9479.
- Elenkov, I. J., Papanicolaou, D. A., Wilder, R. L., & Chrousos, G. P. (1996). Modulatory effects of glucocorticoids and catecholamines on human interleukin-12 and

- interleukin-10 production: clinical implications. *Proceedings of the Association of American Physicians*, 108, 374-381.
- Elenkov, I. J., Webster, E., Papanicolaou, D. A., Fleisher, T. A., Chrousos, G. P., & Wilder, R. L. (1998). Histamine potently suppresses human IL-12 and stimulates IL-10 production via H2 receptors. *The Journal of Immunology*, 161, 2586-2593.
- Elias, J. A., Freundlich, B., Adams, S., & Rosenbloom, J. (1990). Regulation of human lung fibroblast collagen production by recombinant interleukin-1, tumor necrosis factor, and interferon-gamma. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 580, 233-244.
- Elovic, A. E., Ohshima, H., Sauty, A., McBride, J., Tsuji, T., Nagai, M., . . . Wong, D. T. (1998). IL-4-dependent regulation of TGF- α and TGF- β 1 expression in human eosinophils. *The Journal of Immunology*, 160, 6121-6127.
- Enk, C. D., Sredni, D., Blauvelt, A., & Katz, S. I. (1995). Induction of IL-10 gene expression in human keratinocytes by UVB exposure in vivo and in vitro. *The Journal of Immunology*, 154, 4851-4856.
- Esche, C., Shurin, M. R., & Lotze, M. T. (2000). IL-12. In M. Feldmann, S. Durum, T. Hirano, J. Vilcek, N. Nicola, & J. J. Oppenheim, *Cytokine Reference: A Compendium of Cytokines and Other Mediators of Host Defense* (pp. 187-201). Waltham: Academic Press.
- Espevik, T., Waage, A., Faxvaag, A., & Shalaby, M. R. (1990). Regulation of interleukin-2 and interleukin-6 production from t-cells: involvement of interleukin-1 β and transforming growth factor- β . *Cellular Immunology*, 126, 47-56.
- Esser, M. T., Dinglasan, R. D., Krishnamurthy, B., Gullo, C. A., Graham, M. B., & Braciale, V. L. (1997). IL-2 induces Fas ligand/Fas (CD95L/CD95) cytotoxicity in CD8+ and CD4+ T lymphocyte clones. *The Journal of Immunology*, 158, 5612-5618.
- Ethuin, F., Delarche, C., Benslama, S., Gougerot-Pocidalo, M. A., Jacob, L., & Chollet-Martin, S. (2001). Interleukin-12 increases interleukin 8 production and release by human polymorphonuclear neutrophils. *Journal of leukocyte biology*, 70, 439-446.
- Euqui, E. M., DeLustro, B., Rouhafza, S., Ilnicka, M., Lee, S. W., Wilhelm, R., & Allison, A. C. (1994). Some antioxidants inhibit, in a co-ordinate fashion, the production of tumor necrosis factor- α , IL- β , and IL-6 by human peripheral blood mononuclear cells. *International Immunology*, 6, 409-422.
- European Commission. (19 de Novembro de 2015). *Natura 2000 Network*. Obtido em 4 de Setembro de 2015, de European Commission Environment: http://ec.europa.eu/environment/nature/natura2000/index_en.htm
- Falvo, J. V., Uglierolo, A. M., Brinkman, B. M., Merika, M., Parekh, B. S., Tsai, E. Y., . . . Goldfeld, A. E. (2000). Stimulus-Specific Assembly of Enhancer Complexes on the Tumor Necrosis Factor Alpha Gene Promoter. *Molecular and Cellular Biology*, 20, 2239-2247.
- Farrar, J. J., & Hilsfiker, M. L. (1982). Antigen-nonspecific helper factors in the antibody response. *Federation Proceedings*, 41, 263-268.
- Feder, L. S., Todaro, J. A., & Laskin, D. L. (1993). Characterization of interleukin-1 and interleukin-6 production by hepatic endothelial cells and macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*, 53, 126-132.
- Feghali, C. A., Bost, K. L., Boulware, D. W., & Levy, L. S. (1992). Human recombinant interleukin-4 induces proliferation and interleukin-6 production by cultured human skin fibroblasts. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 63, 182-187.
- Feng, N., Heim, M. H., Adam, M., Schyder, B., Etter, H., Yamage, M., . . . Moser, R. (1997). Tumor necrosis factor α enhances the expression of the interleukin (IL)-4 receptor α -chain on endothelial cells increasing IL-4 or IL-13-induced Stat6 activation. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 5487-5494.
- Fernandez-Botran, R., Sanders, V. M., Mosmann, T. R., & Vitetta, E. S. (1988). Lymphokine-mediated regulation of the proliferative response of clones of T helper 1 and T helper 2 cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 168, 543-558.
- Fertsch, D., Schoenberg, D. R., Germain, R. N., Tou, J. Y., & Vogel, S. N. (1987). Induction of macrophage Ia antigen expression by rIFN- γ and down-regulation by IFN- α / β and dexamethasone are mediated by changes in steady-state levels of Ia mRNA. *The Journal of Immunology*, 139, 244-249.

- Fleming, S. B., McCaughan, C. A., Andrews, A. E., Nash, A. D., & Mercer, A. A. (1997). A homolog of interleukin-10 is encoded by the poxvirus orf virus. *Journal of Virology*, 71, 4857-4861.
- Flohr, T., Buwitt, U., Bonnekoh, B., Decker, T., & Böttger, E. C. (1992). Interferon-gamma regulates expression of a novel keratin class I gene. *European Journal of Immunology*, 22, 975-979.
- Fluckinger, A. C., Garrone, P., Durand, I., Galizzi, J. P., & Banchereau, J. (1993). Interleukin 10 (IL-10) upregulates functional high affinity IL-2 receptors on normal and leukemic B lymphocytes. *The Journal of experimental medicine*, 178, 1473-1481.
- Fonfara, S., Kakuschke, A., Rosenberger, T., Siebert, U., & Prange, A. (2008). Cytokine and acute phase protein expression in blood samples of harbour seal pups. *Marine Biology*, 3, 337-345.
- Fonfara, S., Siebert, U., Prange, A., & Colijn, F. (2007). The impact of stress on cytokine and haptoglobin mRNA expression in blood samples from harbour porpoises (*Phocoena phocoena*). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 87, 303-311.
- Fong, T. A., & Mosmann, T. R. (1990). Alloreactive murine CD8+ T cell clones secrete the Th1 pattern of cytokines. *The Journal of Immunology*, 144, 1744-1752.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO]. (2014). *The State of World Fisheries and Aquaculture*. Roma: FAO.
- Freedman, A. S., Freeman, G. J., Rhyhart, K., & Nadler, L. M. (1991). Selective induction of B7/BB-1 on interferon-gamma stimulated monocytes: a potential mechanism for amplification of T cell activation through the CD28 pathway. *Cellular Immunology*, 137, 429-437.
- Frost, A., Jonsson, K. B., Brändström, H., Ohlsson, C., Ljunghall, S., & Ljunggren, Ö. (1998). Interleukin-13 Inhibits Cell Proliferation and Stimulates Interleukin-6 Formation in Isolated Human Osteoblasts. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 83, 3285-3289.
- Fujimoto, M., Serada, S., Mihara, M., Uchiyama, Y., Yoshida, H., Koike, N., . . . Naka, T. (2008). Interleukin-6 blockade suppresses autoimmune arthritis in mice by the inhibition of inflammatory Th17 responses. *Arthritis and rheumatism*, 58, 3710-3719.
- Fultz, M. J., Barber, S. A., Dieffenbach, C. W., & Vogel, S. N. (1993). Induction of IFN-gamma in macrophages by lipopolysaccharide. *International Immunology*, 5, 1383-1392.
- Funke, C., King, D. P., McBain, J. F., Adelung, D., & Stott, J. L. (2003). Expression and functional characterization of killer whale (*Orcinus orca*) interleukin-6 (IL-6) and development of a competitive immunoassay. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 93, 69-79.
- Gajewski, T. F., & Fitch, F. W. (1988). Anti-proliferative effect of IFN-gamma in immune regulation: I IFN-gamma inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones. *The Journal of Immunology*, 140, 4245-4242.
- Gardella, S., Andrei, C., Costigliolo, S., Olcese, L., Zocchi, M. R., & Rubartelli, A. (2000). Secretion of bioactive interleukin-1beta by dendritic cells is modulated by interaction with antigen specific T cells. *Blood*, 95, 3809-3815.
- Garfias, Y., Ortiz, B., Hernández, J., Magaña, D., Becerril-Angeles, M., Zenteno, E., & Lascrain, R. (2006). CD4+ CD30+ T cells perpetuate IL-5 production in Dermatophagoides pteronyssinus allergic patients. *Allergy*, 61, 27-34.
- Gastl, G. A., Abrams, J. S., Nanus, D. M., Oosterkamp, R., Silver, J., Liu, F., . . . Bander, N. H. (1993). Interleukin-10 production by human carcinoma cell lines and its relationship to interleukin-6 expression. *International Journal of Cancer*, 55, 96-101.
- Gately, M. K., Wolitzky, A. G., Quinn, P. M., & Chizzonite, R. (1992). Regulation of human cytolytic lymphocyte responses by interleukin-12. *Cell Immunology*, 143, 127-142.
- Gauldie, J., Richards, C., Harnish, D., Lansdorp, P., & Baumann, H. (1987). Interferon beta 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84, 7251-7255.

- Gautam, S., Tebo, J. M., & Hamilton, T. A. (1992). IL-4 suppresses cytokine gene expression induced by IFN-gamma and/or IL-2 in murine peritoneal macrophages. *The Journal of Immunology*, 148, 1725-1730.
- Gazinelli, R., Oswald, I. P., James, S. L., & Sher, A. (1992). IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN-gamma-activated macrophages. *The Journal of Immunology*, 148, 1792-1796.
- Ghasemi, A., & Zahediasl, S. (2012). Normality Tests for Statistical Analysis: A Guide for Non-Statisticians. *International Journal of Endocrinology and Metabolism*, 10, 486-489.
- Ghezzi, P., Dinarello, C. A., Bianchi, M., Rosandich, M. E., Repine, J. E., & White, C. W. (1991). Hypoxia increases production of interleukin-1 and tumor necrosis factor by human mononuclear cells. *Cytokine*, 189-194.
- Ghildyal, N., Friendl, D. S., Nicodemus, C. F., Austen, K. F., & Stevens, R. L. (1993). Reversible expression of mouse mast cell protease 2 mRNA and protein in cultured mast cells exposed to IL-10. *The Journal of Immunology*, 151, 3206-3214.
- Ghildyal, N., McNeil, H. P., Gurish, M. F., Austen, K. F., & Stevens, R. L. (1992b). Transcriptional regulation of the mucosal mast cell-specific protease gene, MMCP-2, by interleukin 10 and interleukin 3. *The Journal of biological chemistry*, 267, 8473-8477.
- Ghildyal, N., McNeil, H. P., Stechschulte, S., Austen, K. F., Silberstein, D., Gurish, M. F., . . . Stevens, R. L. (1992a). IL-10 induces transcription of the gene for mouse mast cell protease-1, a serine protease preferentially expressed in mucosal mast cells of *Trichinella spiralis*-infected mice. *The Journal of Immunology*, 149, 2123-2129.
- Gillis, S., Crabtree, G. R., & Smith, K. A. (1979a). Glucocorticoid-Induced Inhibition of T Cell Growth Factor Production: I. The Effect on Mitogen-Induced Lymphocyte Proliferation. *The Journal of Immunology*, 123, 1624-1631.
- Gillis, S., Crabtree, G. R., & Smith, K. A. (1979b). Glucocorticoid-Induced Inhibition of T Cell Growth Factor Production: II. The Effect on the in Vitro Generation of Cytolytic T Cells. *The Journal of Immunology*, 123, 1632-1638.
- Giovarelli, M., Musiani, P., Modesti, A., Dellabona, P., Casorati, G., Allione, A., . . . Forni, G. (1995). Local Release of IL-10 by transfected mouse mammary adenocarcinoma cells does not suppress but enhances anti-tumor reaction and elicits a strong cytotoxic lymphocyte and antibody-dependent immune memory. *The Journal of Immunology*, 155, 3112-3123.
- Giraud, E., Primo, L., Audero, E., Gerber, H.-P., Koolwijk, P., Soker, S., . . . Bussolino, F. (1998). Tumor necrosis factor-alpha regulates expression of vascular endothelial growth factor receptor-2 and of its co-receptor neuropilin-1 in human vascular endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 22128-22135.
- Go, N. F., Castle, B. E., Barrett, R., Kastelein, R., Dang, W., Mosmann, T. R., . . . Howard, M. (1990). Interleukin 10, a novel B cell stimulatory factor: unresponsiveness of X chromosome-linked immunodeficiency B cells. *The Journal of experimental medicine*, 172, 1625-1631.
- Goebeler, M., Schnarr, B., Toksoy, A., Kunz, M., Bröcker, E., Duschl, A., & Gillitzer, R. (1997). Interleukin-13 selectively induces monocyte chemoattractant protein-1 synthesis and secretion by human endothelial cells. Involvement of IL-4R alpha and Stat6 phosphorylation. *Immunology*, 91, 450-457.
- Gordon, J. R., & Galli, S. J. (1990). Mast cells as a source of both preformed and immunologically inducible TNF- α /cachectin. *Nature*, 346, 274 - 276.
- Governo de Portugal. (2013-2020). Anexo B - O Plano Mar-Portugal. *Estratégia Nacional para o Mar*.
- Granowitz, E. V., Santos, A., Poutsika, D. D., Cannon, J. G., Wilmore, D. A., Wolff, S. M., & Dinarello, C. A. (1991). Circulating interleukin-1 receptor antagonist levels during experimental endotoxemia in humans. *Lancet*, 338, 1423-1434.
- Griggs, N. D., Jarpe, M. A., Pace, J. L., Russell, S. W., & Johnson, H. M. (1992). The N-terminus and C-terminus of IFN-gamma are binding domains for cloned soluble IFN-gamma receptor. *The Journal of Immunology*, 149, 517-520.

- Grohmann, U., Belladonna, M. L., Bianchi, R., Orabona, C., Ayroldi, E., Fioretti, M. C., & Puccetti, P. (1998). IL-12 acts directly on DC to promote nuclear localization of NF- κ B and primes DC for IL-12 production. *Immunity*, 9, 315-323.
- Grossman, R. M., Krueger, J., Yourish, D., Piperno, A. G., Murphy, D. P., May, L. T., . . . Gottlieb, A. B. (1989). Interleukin 6 is expressed in high levels in psoriatic skin and stimulates proliferation of cultured human keratinocytes. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 6367-6371.
- Groux, H., Bigler, M., de Vries, J. E., & Roncarolo, M. G. (1996). Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4+. *The Journal of Experimental Medicine*, 184, 19-29.
- Gruber, M. F., Williams, C. C., & Gerrard, T. L. (1994). Macrophage-colony-stimulating factor expression by anti-CD45 stimulated human monocytes is transcriptionally up-regulated by IL-1 beta and inhibited by IL-4 and IL-10. *The Journal of Immunology*, 152, 1354-1361.
- Guerne, P. A., Carson, D. A., & Lotz, M. (1990). IL-6 production by human articular chondrocytes. Modulation of its synthesis by cytokines, growth factors, and hormones in vitro. *Journal of Immunology*, 144, 499-505.
- Gulland, F. M., & Hall, A. J. (2007). Is Marine Mammal Health Deteriorating? Trends in the Global Reporting of Marine Mammal Disease. *EcoHealth*, 135-150.
- Ha, S. J., Lee, S. B., Kim, C. M., Jang, K. L., Shin, H. S., & Sung, Y. C. (1999). A novel function of IL-12p40 as a chemotactic molecule for macrophages. *The Journal of Immunology*, 163, 2902-2908.
- Hagan, J. B., Bartemes, K. R., Kita, H., Ottesen, E. A., Awadzi, K., Nutman, T. B., & Gleich, G. J. (1996). Elevations in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-5 levels precede posttreatment eosinophilia in onchocerciasis. *The Journal of Infectious Diseases*, 173, 1277-1280.
- Hamaguchi, Y., Hanakura, Y., Fujita, J., Takeda, S.-I., Nakano, T., Tarui, S., . . . Kitamura, Y. (1987). Interleukin 4 as an essential factor for in vitro clonal growth of murine connective tissue-type mast cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 165, 268-273.
- Hamid, Q., Barkins, J., Meng, Q., Yang, S., Abrama, J. S., Kay, A. B., & Moqbel, R. (1992). Human eosinophils synthesize and secrete interleukin-6, in vitro. *Blood*, 80, 1496-1501.
- Hammond, P., Bearzi, G., Bjørge, A., Forney, K., Karczmarski, L., Kasuya, T., . . . Wilson, B. (2008). *Delphinus delphis*. Obtido em 3 de Setembro de 2015, de The IUCN Red List of Threatened Species: <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T6336A12649851.en>
- Handa, K., Suzuki, R., Matsui, H., Shimizu, Y., & Kumagai, K. (1983). Natural killer (NK) cells as a responder to interleukin 2 (IL 2): II. IL 2-induced interferon gamma production. *The Journal of Immunology*, 130, 988-992.
- Harris, N., Buller, R. M., & Karupiah, G. (1995). Gamma interferon-induced, nitric oxide-mediated inhibition of vaccinia virus replication. *Journal of Virology*, 69, 910-915.
- Hayes, M. P., Wang, J., & Norcross, M. A. (1995). Regulation of interleukin-12 expression in human monocytes: selective priming by interferon-gamma of lipopolysaccharide-inducible p35 and p40 genes. *Blood*, 86, 646-650.
- Hempel, L., Körholz, D., Bönig, H., Schneider, M., Krein-Vehne, A., Packeisen, J., . . . Burdach, S. (1995). Interleukin-10 directly inhibits the interleukin-6 production in T-cells. *Scandinavian Journal of Immunology*, 41, 462-466.
- Hoffman, J. I., Thorne, M. A., Trathan, P. N., & Forcada, J. (2013). Transcriptome of the dead: characterisation of immune genes and marker development from necropsy samples in a free-ranging marine mammal. *BMC genomics*, 14, 52.
- Hogan, S. P., Koskinen, A., Matthaei, K. I., Young, I. G., & Foster, P. S. (1998). Interleukin-5-producing CD4+ T cells play a pivotal role in aeroallergen-induced eosinophilia, bronchial hyperreactivity, and lung damage in mice. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 157, 210-218.
- Horikawa, K., & Takatsu, K. (2006). Interleukin-5 regulates genes involved in B-cell terminal maturation. *Immunology*, 118, 497-508.

- Hoshino, T., Wiltout, R. H., & Young, H. A. (1999). IL-18 is a potent coinducer of IL-13 in NK and T cells: a new potential role for IL-18 in modulating the immune response. *The Journal of Immunology*, 162, 5070-5077.
- Hoshino, T., Winkler-Pickett, R. T., Mason, A. T., Ortaldo, J. R., & Young, H. A. (1999). IL-13 production by NK cells: IL-13-producing NK and T cells are present in vivo in the absence of IFN-gamma. *The Journal of Immunology*, 162, 51-59.
- Hsu, D. H., de Wall Malefyt, R., Fiorentino, D. F., Dang, M. N., Vieira, P., de Vries, J., . . . Moore, K. W. (1990). Expression of interleukin-10 activity by Epstein-Barr virus protein BCRF1. *Science*, 250, 830-832.
- Hu, X., Li, W.-P., Meng, C., & Ivashkiv, L. B. (2003). Inhibition of IFN-gamma signaling by glucocorticoids. *The Journal of Immunology*, 170, 4833-4839.
- Huau, F., Liu, T., McGarry, B., Ullenbruch, M., & Phan, S. H. (2003). Dual roles of IL-4 in lung injury and fibrosis. *The Journal of Immunology*, 170, 2083-2092.
- Inoue, Y., Itou, T., Oike, T., & Sakai, T. (1999). Cloning and sequencing of the bottle-nosed dolphin (*Tursiops truncatus*) interferon-gamma gene. *The Journal of veterinary medical science*, 61, 939-942.
- Inoue, Y., Itou, T., Sakai, T., & Oike, T. (1999). Cloning and Sequencing of a Bottle-Nosed Dolphin (*Tursiops truncatus*) Interleukin-4- Encoding cDNA. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science*, 693-696.
- Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas [ICNF]. (2015). O ICNF. Obtido em 4 de Setembro de 2015, de Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas: <http://www.icnf.pt/portal/icnf>
- International Whaling Commission [IWC]. (2015). *Membership and Contracting Governments*. Obtido em 5 de Setembro de 2015, de International Whaling Commission: <https://iwc.int/members>
- Ishibashi, T., Kimura, H., Uchida, T., Kariyone, S., Friese, P., & Burstein, A. S. (1989). Human interleukin 6 is a direct promoter of maturation of megakaryocytes in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86, 5953-5957.
- Ishimi, Y., Miyaura, C., Jin, C. H., Akatsu, T., Abe, E., Nakamura, Y., . . . Suda, T. (1990). IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption. *Journal of Immunology*, 145, 3297-3303.
- Itoh, K., & Hirohata, S. (1995). The role of IL-10 in human B cell activation, proliferation, and differentiation. *The Journal of Immunology*, 154, 4341-4350.
- Itou, T., Shoji, Y., Shiraishi, R., Sugisawa, H., Endo, T., Inoue, Y., & Sakai, T. (2002). Priming of dolphin neutrophil respiratory burst by recombinant tumor necrosis factor alpha. *Developmental and Comparative Immunology*, 26, 675-679.
- Iwasaki, A., & Kelsall, B. L. (1999). Freshly isolated Peyer's patch, but not spleen, dendritic cells produce interleukin 10 and induce the differentiation of T helper type 2 cells. *The Journal of experimental medicine*, 190, 229-239.
- Jacobsen, S. E., Veiby, O. P., & Smeland, E. B. (1993). Cytotoxic lymphocyte maturation factor (interleukin 12) is a synergistic growth factor for hematopoietic stem cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 178, 413-418.
- Jain-Vora, S., Wert, S. E., Temann, U. A., Rankin, J. A., & Whitsett, J. A. (1988). Interleukin-4 alters epithelial cell differentiation and surfactant homeostasis in the postnatal mouse lung. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85, 6880-6884.
- Jimi, E., Nakamura, I., Duong, L. T., Ikebe, T., Takahashi, N., Rodan, G. A., & Suda, T. (1999). Interleukin 1 Induces Multinucleation and Bone-Resorbing Activity of Osteoclasts in the Absence of Osteoblasts/Stromal Cells. *Experimental Cell Research*, 247, 84-93.
- Jimenez, S. A., Freundlich, B., & Rosenbloom, J. (1984). Selective inhibition of human diploid fibroblast collagen synthesis by interferons. *The Journal of Clinical Investigation*, 74, 1112-1116.
- Jinquan, T., Deleuran, B., Gesser, B., Maare, H., Deleuran, M., Larsen, C. G., & Thestrup-Pedersen, K. (1995). Regulation of human T lymphocyte chemotaxis in vitro by T cell-

- derived cytokines IL-2, IFN-gamma, IL-4, IL-10, and IL-13. *The Journal of Immunology*, 154, 3742-3752.
- Jinquan, T., Larsen, C. G., Gesser, B., Matsushima, K., & Thestrup, P. K. (1993). Human IL-10 is a chemoattractant for CD8⁺ T lymphocytes and an inhibitor of IL-8-induced CD4⁺ T lymphocyte migration. *The Journal of Immunology*, 151, 4545-4551.
- June, C. H., Ledbetter, J. A., Gillespie, M. M., Lindsten, T., & Thompson, C. B. (1987). T-cell proliferation involving the CD28 pathway is associated with cyclosporine-resistant interleukin 2 gene expression. *Molecular and Cellular Biology*, 7, 4472-4481.
- Kaiser, P., Wain, H. L., & Rothwell, L. (1998). Structure of the chicken interferon-gamma gene, and comparison to mammalian homologues. *Gene*, 207, 25-32.
- Kameda, T., Matsuzaki, N., Sawai, K., Okada, T., Saji, F., Matsuda, T., . . . Tanizawa, O. (1990). Production of interleukin-6 by normal human trophoblast. *Placenta*, 11, 205-213.
- Kamijo, R., Shapiro, D., Le, J., Huang, S., Aguet, M., & Vilček, J. (1993). Generation of nitric oxide and induction of major histocompatibility complex class II antigen in macrophages from mice lacking the interferon gamma receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 6626-6630.
- Kang, C.-m., Jang, A.-S., Ahn, M.-H., Shin, J.-A., Kim, J.-H., Choi, Y.-S., . . . Park, C.-S. (2005). Interleukin-25 and interleukin-13 production by alveolar macrophages in response to particles. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 33, 290-296.
- Kang, K., Kubin, M., Cooper, K. D., Lessin, S. R., Trinchieri, G., & Rook, A. H. (1996). IL-12 synthesis by human Langerhans cells. *The Journal of Immunology*, 156, 1402-1407.
- Kaplanski, G., Farnier, C., Kaplanski, S., Porat, R., Shapiro, L., Bongrand, P., & Dinarello, C. A. (1994). Interleukin-1 induces interleukin-8 secretion from endothelial cells by a juxtacrine mechanism. *Blood*, 84, 4242-4248.
- Kasahara, T., Hooks, J. J., Dougherty, S. F., & Oppenheim, J. J. (1983). Interleukin 2-mediated immune interferon (IFN-gamma) production by human T cells and T cell subsets. *The Journal of Immunology*, 130, 1784-1789.
- Kasama, T., Strieter, R. M., Lukacs, N. W., Burdick, M. D., & Kunkel, S. L. (1994). Regulation of neutrophil-derived chemokine expression by IL-10. *The Journal of Immunology*, 152, 3559-3569.
- Kashii, Y., Giorda, R., Herberman, R. B., Whiteside, T. L., & Vujanovic, N. L. (1999). Constitutive Expression and Role of the TNF Family Ligands in Apoptotic Killing of Tumor Cells by Human NK Cells. *The Journal of Immunology*, 163, 5358-5366.
- Keegan, A. D. (2000). IL-4. In M. Feldmann, S. Durum, T. Hirano, J. Vilcek, N. Nicola, & J. J. Oppenheim, *Cytokine Reference: A Compendium of Cytokines and Other Mediators of Host Defense* (pp. 127-135). Waltham: Academic Press.
- Keegan, A. D. (2000). IL-4 Receptor. In M. Feldmann, S. Durum, T. Hirano, J. Vilcek, N. Nicola, & J. J. Oppenheim, *Cytokine Reference: A Compendium of Cytokines and Other Mediators of Host Defense* (pp. 1471-1480). Waltham: Academic Press.
- Kidd, P. (2003). Th1/Th2 Balance: The Hypothesis, its Limitations, and Implications for Health and Disease. *Alternative Medicine Review*, 8, 223-246.
- King, D. P., Aldridge, B. M., Kennedy-Stoskopf, S., & Stott, J. L. (2001). Immunology. In L. A. Dierauf, & F. M. Gulland, *CRC Handbook of Marine Mammal Medicine (Second Edition)* (pp. 217-252). Boca Raton, Florida, USA: CRC Press.
- Klebb, G., Autenrieth, I. B., Haber, H., Gillert, E., Sadlack, B., & Smith, K. A. (1996). Interleukin-2 is indispensable for development of immunological self-tolerance. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 81, 282-286.
- Kneitz, B., Herrmann, T., Yonohara, S., & Schimpl, A. (1995). Normal clonal expansion but impaired Fas-mediated cell death and anergy induction in interleukin-2-deficient mice. *European Journal of Immunology*, 25, 2572-2577.
- Knolle, P. A., Uhrig, A., Protzer, U., Trippler, M., Duchmann, R., Meyer zum Büschenfelde, K.-H., & Gerken, G. (1998). Interleukin-10 expression is autoregulated at the transcriptional level in human and murine Kupffer cells. *Hepatology*, 27, 93-99.
- Kohase, M., May, L. T., Tamm, I., Vilcek, J., & Sehgal, P. B. (1987). A cytokine network in human diploid fibroblasts: interactions of beta-interferons, tumor necrosis factor,

- platelet derived growth factor, and interleukin-1. *Molecular and Cellular Biology*, 7, 273-280.
- Kopf, M., Le Gros, G., Bachmann, M., Lamers, M. C., Bluethmann, H., & Köhler, G. (1993). Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses. *Nature*, 362, 245-248.
- Kotenko, S. V., Krause, C. D., Izotova, L. S., Pollack, B. P., Wu, W., & Pestka, S. (1997). Identification and functional characterization of a second chain of the interleukin-10 receptor complex. *The EMBO journal*, 16, 5894-5903.
- Kotowicz, K., Callard, R. E., Friedrich, K., Matthews, D. J., & Klein, N. (1996). Biological activity of IL-4 and IL-13 on human endothelial cells: functional evidence that both cytokines act through the same receptor. *International Immunology*, 8, 1915-1925.
- Kotowicz, K., & Callard, R. E. (1993). Human immunoglobulin class and IgG subclass regulation: dual action of interleukin-4. *European Journal of Immunology*, 23, 2250-2256.
- Kraaiem, Z., Sobel, E., Sadeh, O., Kinarty, A., & Lahat, N. (1990). Effects of gamma-interferon on DR antigen expression, growth, 3,5,3'-triiodothyronine secretion, iodine uptake and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate accumulation in cultured human thyroid cells. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 71, 817-824.
- Kuga, S., Otsuka, T., Niino, H., Nunoi, H., Nemoto, Y., Nakano, T., . . . Niho, Y. (1996). Suppression of superoxide anion production by interleukin-10 is accompanied by a downregulation of the genes for subunit proteins of NADPH oxidase. *Experimental Hematology*, 24, 151-157.
- Kung, A. W., & Lau, K. S. (1990). Interferon-gamma inhibits thyrotropin-induced thyroglobulin gene transcription in cultured human thyrocytes. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 70, 1512-1517.
- Lacraz, S., Nicod, L. P., Chicheportiche, R., Welgus, H. G., & Dayer, J.-M. (1995). IL-10 inhibits metalloproteinase and stimulates TIMP-1 production in human mononuclear phagocytes. *Journal of Clinical Investigation*, 96, 2304-2310.
- Lagoo, A., Tseng, C. K., & Sell, S. (1990). Interleukin 2 produced by activated B lymphocytes acts as an autocrine proliferation-inducing lymphokine. *Cytokine*, 2, 272-279.
- Landolfo, S., Gariglio, M., Gribaudo, G., Jemma, C., Giovarelli, M., & Cavallo, G. (1988). Interferon-gamma is not an antiviral, but a growth promoting factor for T lymphocytes. *European Journal of Immunology*, 18, 503-509.
- Lee, C.-E., Yoon, S.-R., & Pyun, K.-H. (1993). Interleukin-4 Signals Regulating CD23 Gene Expression in Human B Cells: Protein Kinase C-Independent Signaling Pathways. *Cellular Immunology*, 146, 171-185.
- Lehmann, C., Zeis, M., & Uharek, L. (2001). Activation of natural killer cells with interleukin 2 (IL-2) and IL-12 increases perforin binding and subsequent lysis of tumour cells. *British Journal of Haematology*, 114, 660-665.
- Leite-De-Moraes, M. C., Moreau, G., Arnould, A., Machavoine, F., Garcia, C., Papiernik, M., & Dy, M. (1998). IL-4-producing NK T cells are biased towards IFN-gamma production by IL-12. Influence of the microenvironment on the functional capacities of NK T cells. *European journal of immunology*, 28, 1507-1515.
- Levings, M. K., & Schrader, J. W. (1999). IL-4 Inhibits the Production of TNF- α and IL-12 by STAT6-Dependent and -Independent Mechanisms. *The Journal of Immunology*, 162, 5224-5229.
- Levy, Y., & Brouet, J. C. (1994). Interleukin-10 prevents spontaneous death of germinal center B cells by induction of the bcl-2 protein. *The Journal of Clinical Investigation*, 93, 424-428.
- Libby, P., Warner, S. J., & Friedman, G. B. (1988). Interleukin 1: a mitogen for human vascular smooth muscle cells that induces the release of growth-inhibitory prostanooids. *The Journal of Clinical Investigation*, 81, 487-498.
- LIFE+MarPro. (12 de Novembro de 2013). O Projecto LIFE+ MarPro. Obtido em 4 de Setembro de 2015, de MARPRO Conservation of Marine Protected Species in Mainland Portugal: <http://marprolife.org/index.php/pt/project#.VISYeL8roQs>

- Ling, P. D., Warren, M. K., & Vogel, S. N. (1985). Antagonistic effect of interferon-alpha/beta on the interferon-gamma-induced expression of Ia antigen in murine macrophages. *The Journal of Immunology*, 135, 1857-1863.
- Liu, X., Kohyama, T., Wang, H., Zhu, Y. K., Wen, F.-Q., Kim, H. J., . . . Rennard, S. I. (2002). Th2 cytokine regulation of type I collagen gel contraction mediated by human lung mesenchymal cells. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 282, L1049-L1056.
- Liu, Y., & Janeway, C. J. (1990). Interferon gamma plays a critical role in induced cell death of effector T cell: a possible third mechanism of self-tolerance. *The Journal of Experimental Medicine*, 172, 1735-1739.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25, 402-408.
- Loppnow, H., & Libby, P. (1990). Proliferating or interleukin 1-activated human vascular smooth muscle cells secrete copious interleukin 6. *The Journal of Clinical Investigation*, 731-738.
- Loughnan, M. S., Takatsu, K., Harada, N., & Nossal, G. J. (1987). T-cell-replacing factor (interleukin 5) induces expression of interleukin 2 receptors on murine splenic B cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84, 5399-5403.
- Lowenthal, J. W., Ballard, D. W., Böhnlein, E., & Greene, W. C. (1989). Tumor necrosis factor alpha induces proteins that bind specifically to kappa B-like enhancer elements and regulate interleukin 2 receptor alpha-chain gene expression in primary human T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86, 2331-2335.
- M@RBIS - Sistema de Informação para a Biodiversidade Marinha. (2015). Obtido em 3 de Setembro de 2015, de Estrutura de Missão para a Extensão da Plataforma Continental: <http://www.emepc.pt/pt/o-projeto-marbis#>
- Ma, X., Chow, J. M., Gri, G., Carra, G., Gerosa, F., Wolf, S. F., . . . Trinchieri, G. (1996). The Interleukin 12 p40 Gene Promoter is Primed by Interferon Gamma in Monocytic Cells. *The Journal Of Experimental Medicine*, 183, 147-157.
- Ma, Y., Hurst, H. E., & Fernandez-Botran, R. (1996). Soluble cytokine receptors as carrier proteins: effects of soluble IL-4 receptors on the pharmacokinetics of murine IL-4. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 279, 340-350.
- Mackay, F., Loetscher, H., Stueber, D., Gehr, G., & Lesslauer, W. (1993). Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha)-induced cell adhesion to human endothelial cells is under dominant control of one TNF receptor type, TNF-R55. *The Journal of experimental medicine*, 177, 1277-1286.
- Manetti, R., Parronchi, P., Giudizi, M. G., Piccinni, M.-P., Maggi, E., Trinchieri, G., & Romagnani, S. (1993). Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces t helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of il-4-producing cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 177, 1199-1204.
- Manna, S. K., & Aggarwal, B. B. (1998). IL-13 suppresses TNF-induced activation of nuclear factor-kappa B, activation protein-1, and apoptosis. *The Journal of Immunology*, 161, 2863-2872.
- Maraskowsky, E., Chen, W., & Shortman, K. (1989). IL-2 and IFN-gamma are two necessary lymphokines in the development of cytolytic T cells. *The Journal of Immunology*, 143, 1210-1214.
- Marfaing-Koka, A., Devergne, O., Gorgone, G., Portier, A., Schall, T. J., Galanaud, P., & Emile, D. (1995). Regulation of the production of the RANTES chemokine by endothelial cells. Synergistic induction by IFN-gamma plus TNF-alpha and inhibition by IL-4 and IL-13. *The Journal of Immunology*, 154, 1870-1878.
- Marfaing-Koka, A., Maravic, M., Humbert, M., Galanaud, P., & Emilie, D. (1996). Contrasting effects of IL-4, IL-10 and corticosteroids on RANTES production by human monocytes. *International immunology*, 8, 1587-1594.
- Marie, C., Pitton, C., Fitting, C., & Cavaillon, J. M. (1996). IL-10 and IL-4 synergize with TNF-alpha to induce IL-1ra production by human neutrophils. *Cytokine*, 8, 147-151.

- Marziali, G., Fiorucci, G., Coccia, E. M., Percario, Z., Raber, J., Battistini, A., . . . Romeo, G. (1991). Posttranscriptional regulation of beta interferon expression in erythroid Friend cells treated with gamma interferon. *Journal of Virology*, 65, 4130-4136.
- Matsuda, T., & Hirano, T. (2000). IL-6. In M. Feldmann, S. Durum, T. Hirano, J. Vilcek, N. Nicola, & J. J. Oppenheim, *Cytokine Reference: A Compendium of Cytokines and Other Mediators of Host Defense* (pp. 537-563). Waltham: Academic Press.
- Matsuda, T., & Hirano, T. (2000). IL-6. In M. Feldmann, S. Durum, T. Hirano, J. Vilcek, N. Nicola, & J. J. Oppenheim, *Cytokine Reference: A Compendium of Cytokines and Other Mediators of Host Defense* (pp. 537-563). Waltham: Academic Press.
- Matthews, D. J., & McKenzie, A. N. (2000). IL-13 Receptor. In M. Feldmann, S. Durum, T. Hirano, J. Vilcek, N. Nicola, & J. J. Oppenheim, *Cytokine Reference: A Compendium of Cytokines and Other Mediators of Host Defense* (pp. 1511-1519). Waltham: Academic Press.
- Mattner, F., Fischer, S., Guckes, S., Jin, S., Kaulen, H., Schmitt, E., . . . Germann, T. (1993). The interleukin-12 subunit p40 specifically inhibits effects of the interleukin-12 heterodimer. *The European Journal of Immunology*, 23, 2202-2208.
- May, L. T., Ghrayeb, J., Santhanam, U., Tatter, S. B., Sthoeger, Z., Helfgott, D. C., . . . Sehgal, P. B. (1988). Synthesis and secretion of multiple forms of beta 2-interferon/B-cell differentiation factor 2/hepatocyte-stimulating factor by human fibroblasts and monocytes. *The Journal of biological chemistry*, 263, 7760-7766.
- McCarty, J., Yee, E. K., Deisher, T. A., Harlan, J. M., & Kaushansky, K. (1995). Interleukin-4 induces endothelial vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) by an NF-kb-independent mechanism. *FEBS Letters*, 372, 194-198.
- McHale, J. F., Harari, O. A., Marshall, D., & Haskard, D. O. (1999). TNF-alpha and IL-1 sequentially induce endothelial ICAM-1 and VCAM-1 expression in MRL/lpr lupus-prone mice. *The Journal of Immunology*, 163, 3993-4000.
- McKenzie, A. N., & Matthews, D. J. (2000). IL-13. In M. Feldmann, S. Durum, T. Hirano, J. Vilcek, N. Nicola, & J. J. Oppenheim, *Cytokine Reference: A Compendium of Cytokines and Other Mediators of Host Defense* (pp. 203-211). Waltham: Academic Press.
- McKenzie, A. N., Culpepper, J. A., de Waal Malefyt, R., Brière, F., Punnonen, J., Aversa, G., . . . Zurawski, G. (1993). Interleukin 13, a T-cell-derived cytokine that regulates human monocyte and B-cell function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 3735-3739.
- McKenzie, G. J., Bancroft, A., Grecis, R. K., & McKenzie, A. N. (1998). A distinct role for interleukin-13 in Th2-cell-mediated immune responses. *Current biology*, 8, 339-342.
- Mehrotra, P. T., Donnelly, R. P., Wong, S., Kanegane, H., Geremew, A., Mostowski, H. S., . . . Bloom, E. T. (1998). Interleukin-10 production by human carcinoma cell lines and its relationship to interleukin-6 expression. *The Journal of Immunology*, 160, 2637-2644.
- Michalopoulos, G. K., & DeFrances, M. (1997). Liver Regeneration. *Science*, 276, 60-66.
- Mileno, M. D., Margolis, N. H., Clark, B. D., Dinarello, C. A., Burke, J. F., & Gelfand, J. A. (1995). Coagulation of whole blood stimulates interleukin-1 β gene expression: absence of gene transcripts in anticoagulated blood. *Journal of Infectious Diseases*, 172, 308-311.
- Minty, A., Chalon, P., Derocq, J. M., Dumont, X., Guillemot, J. C., Kaghad, M., . . . Caput, D. (1993). Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses. *Nature*, 362, 248-250.
- Miossec, P., & Ziff, M. (1986). Immune interferon enhances the production of interleukin 1 by human endothelial cells stimulated with lipopolysaccharide. *The Journal of Immunology*, 137, 2848-2852.
- Mitani, H., Katayama, N., Araki, H., Ohishi, K., Kobayashi, K., Suzuki, H., . . . Shiku, H. (2000). Activity of interleukin 6 in the differentiation of monocytes to macrophages and dendritic cells. *British Journal of Haematology*, 109, 288-295.
- Mochizuki, M., Bartels, J., Mallet, A. I., Christophers, E., & Schröder, J.-M. (1998). IL-4 Induces Eotaxin : A Possible Mechanism of Selective Eosinophil Recruitment in Helminth Infection and Atopy. *The Journal of Immunology*, 160, 60-68.

- Möhle, R., Salemi, P., Moore, M. A., & Rafii, S. (1997). Expression of interleukin-5 by human bone marrow microvascular endothelial cells: implications for the regulation of eosinophilopoiesis in vivo. *British Journal of Haematology*, 99, 732-738.
- Moon, B.-g., Takaki, S., Miyake, K., & Takatsu, K. (2004). The role of IL-5 for mature B-1 cells in homeostatic proliferation, cell survival, and Ig production. *The Journal of Immunology*, 172, 6020-6029.
- Moon, H. B., Severinson, E., Heusser, C., Johansson, S. G., Möller, G., & Persson, U. (1989). Regulation of IgG1 and IgE synthesis by interleukin 4 in mouse B cells. *Scandinavian Journal of Immunology*, 30, 355-361.
- Morris, S. C., Madden, K. B., Adamovicz, J. J., Gause, W. C., Hubbard, B. R., Gately, M. K., & Finkelman, F. D. (1994). Effects of IL-12 on in vivo cytokine gene expression and Ig isotype selection. *The Journal of Immunology*, 152, 1047-1056.
- Mukhopadhyay, S., George, A., Bal, V., Ravindran, B., & Rath, S. (1999). Bruton's tyrosine kinase deficiency in macrophages inhibits nitric oxide generation leading to enhancement of IL-12 induction. *The Journal of Immunology*, 163, 1786-1792.
- Muller, G., Saloga, J., Germann, T., Bellinghausen, I., Mohamadzeadeh, M., Knop, J., & Enk, A. H. (1994). Identification and induction of human keratinocyte-derived IL-12. *The Journal of Clinical Investigation*, 94, 1799-1805.
- Munker, R., Gasson, J., Ogawa, M., & Koeffler, H. P. (1986). Recombinant human TNF induces production of granulocyte-monocyte colony-stimulating factor. *Nature*, 323, 79-82.
- Munn, D. H., Beall, A. C., Song, D., Wrenn, R. W., & Throckmorton, D. C. (1995). Activation-induced apoptosis in human macrophages: Developmental regulation of a novel cell death pathway by macrophage colony-stimulating factor and interferon gamma. *The Journal of Experimental Medicine*, 181, 127-136.
- Murao, K., Ohyama, T., Imachi, H., Ishida, T., Cao, W. M., Namiyama, H., . . . Takahara, J. (2000). TNF-alpha stimulation of MCP-1 expression is mediated by the Akt/PKB signal transduction pathway in vascular endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 276, 791-796.
- Nakagawa, T., Hirano, T., Nakagawa, N., Yooshizaki, K., & Kishimoto, T. (1985). Effect of recombinant IL-2 and gamma-IFN on proliferation and differentiation of human B cells. *The Journal of Immunology*, 134, 959-966.
- Nakagawa, T., Nakagawa, N., Goldstein, H., Volkman, D. J., & Fauci, A. S. (1986). Demonstration that human B cells respond differently to interleukin 2 and B cell differentiation factor based on their stages of maturation. *The Journal of Immunology*, 137, 3175-3182.
- Nakao, S., Ogtata, Y., Shimizu, E., Yamazaki, M., Furuyama, S., & Sugiya, H. (2002). Tumor necrosis factor α (TNF- α)-induced prostaglandin E2 release is mediated by the activation of cyclooxygenase-2 (COX-2) transcription via NF κ B in human gingival fibroblasts. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 238, 11-18.
- Nalos, M., Huang, S. J., Pandit, R., & McLean, A. S. (2006). Endotoxin stimulated interleukin-10 production is enhanced by adenosine. Possible key to septic shock associated immune deficiency? *Anaesthesia and intensive care*, 34, 719-723.
- Nathan, C., Murray, H. W., Wiebe, M. E., & Rubin, B. Y. (1983). Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *The Journal of Experimental Medicine*, 158, 670-681.
- Németh, K., Leelahavanichkul, A., Yuen, P. S., Mayer, B., Parmelee, A., Doi, K., . . . Mezey, É. (2009). Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E2-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nature Medicine*, 15, 42-49.
- Neumann, H., Schmidt, H., Wilharm, E., Behrens, L., & Wekerle, H. (1997). Interferon gamma gene expression in sensory neurons: evidence for autocrine gene regulation. *The Journal of experimental medicine*, 186, 2023-2031.
- Niino, H., Otsuka, T., Kuga, S., Nemoto, Y., Abe, M., Hara, N., . . . Niho, Y. (1994). IL-10 inhibits prostaglandin E2 production by lipopolysaccharide-stimulated monocytes. *International Immunology*, 6, 661-664.

- Nishikawa, T., Yamashita, S., Namba, H., Usa, T., Tominaga, T., Kimura, H., . . . Nagataki, S. (1993). Interferon-gamma inhibition of human thyrotropin receptor gene expression. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 77, 1084-1089.
- Noma, T., & Dorf, M. E. (1985). Modulation of suppressor T cell induction with gamma-interferon. *The Journal of Immunology*, 135, 3655-3660.
- Numerof, R. P., Kotik, A. N., Dinarello, C. A., & Mier, J. W. (1990). Pro-interleukin-1 beta production by a subpopulation of human T cells, but not NK cells, in response to interleukin-2. *Cellular Immunology*, 130, 118-128.
- Ochensberger, B., Daepf, G.-C., Rihs, S., & Dahinden, C. A. (1996). Human blood basophils produce interleukin-13 in response to IgE-receptor-dependent and -independent activation. *Blood*, 88, 3028-3037.
- O'Garra, A., Warren, D. J., Holman, M., Popham, A. M., Sanderson, C. J., & Klaus, G. G. (1986). Interleukin 4 (B-cell growth factor II/eosinophil differentiation factor) is a mitogen and differentiation factor for preactivated murine B lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83, 5228-5232.
- Ogawa, M. (1993). Differentiation and Proliferation of Hematopoietic Stem Cells. *Blood*, 81, 2844-2853.
- Ohmori, Y., & Hamilton, T. A. (1994). IFN-gamma selectively inhibits lipopolysaccharide-inducible JE/monocyte chemoattractant protein-1 and KC/GRO/melanoma growth-stimulating activity gene expression in mouse peritoneal macrophages. *The Journal of Immunology*, 153, 2204-2212.
- Ohmori, Y., Schreiber, R. D., & Hamilton, T. A. (1997). Synergy between interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha in transcriptional activation is mediated by cooperation between signal transducer and activator of transcription 1 and nuclear factor kappaB. *The Journal of biological chemistry*, 272, 14899-14907.
- Opata, M. M., Ye, Z., Hollifield, M., & Garvy, B. A. (2013). B Cell Production of Tumor Necrosis Factor in Response to *Pneumocystis murina* Infection in Mice. *Infection and Immunity*, 81, 4252-4260.
- Papiernik, M., de Moraes, M. L., Pontoux, C., Vasseur, F., & Pénit, C. (1998). Regulatory CD4 T cells: Expression of IL-2R α chain, resistance to clonal deletion and IL-2 dependency. *International Immunology*, 10, 371-378.
- Parry, G. C., Martin, T., Felts, K. A., & Cobb, R. R. (1998). IL-1 β -induced monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in endothelial cells is blocked by proteasome inhibitors. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 18, 934-940.
- Pène, J., Rousset, F., Brière, F., Chrétien, I., Bonnefoy, J.-Y., Spits, H., . . . de Vries, J. E. (1988). IgE production by normal human lymphocytes is induced by interleukin 4 and suppressed by interferons gamma and alpha and prostaglandin E₂. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85, 6880-6884.
- Pernis, A., Gupta, S., Gollob, K. J., Garfein, E., Coffman, R. L., Schindler, C., & Rothman, P. (1995). Lack of interferon gamma receptor beta chain and the prevention of interferon gamma signaling in TH1 cells. *Science*, 269, 245-247.
- Piela-Smith, T. H., Broketa, G., Hand, A., & Korn, J. H. (1992). Regulation of ICAM-1 expression and function in human dermal fibroblasts by IL-4. *The Journal of Immunology*, 148, 1375-1381.
- Postlethwaite, A. E., & Seyer, J. M. (1991). Fibroblast chemotaxis induction by human recombinant interleukin-4: Identification by synthetic peptide analysis of two chemotactic domains residing in amino acid sequences 70-88 and 89-122. *The Journal of clinical investigation*, 87, 2147-2152.
- Postlethwaite, A. E., Holness, M. A., Katai, H., & Raghov, R. (1992). Human fibroblasts synthesize elevated levels of extracellular matrix proteins in response to interleukin 4. *Journal of Clinical Investigation*, 90, 1479-1485.
- Postlethwaite, A. E., Lachman, L. B., & Kang, A. H. (1984). Induction of fibroblast proliferation by interleukin-1 derived from human monocytic leukemia cells. *Arthritis and rheumatism*, 27, 995-1001.

- Pouliot, P., Turnel, V., G  linas, E., Laviolette, M., & Bissonnette, E. Y. (2005). Interleukin-4 production by human alveolar macrophages. *Clinical & Experimental Allergy*, 35, 804-810.
- Powers, R., Garrett, D. S., March, C. J., Frieden, E. A., Gronenborn, A. M., & Clore, G. M. (1992). Three-Dimensional Solution Structure of Human Interleukin-4 by Multidimensional Heteronuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Science*, 256, 1673-1677.
- Presky, D. H., Yang, H., Minetti, L. J., Chua, A. O., Nabavi, N., Wu, C.-Y., . . . Gubler, U. (1996). A functional interleukin 12 receptor complex is composed of two beta-type cytokine receptor subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 14002-14007.
- Programa de Monitoriza  o e Programa de Medidas da Diretiva Quadro Estrat  gia Marinha (Minist  rio da Agricultura e do Mar Julho de 2014).
- Promega Corporation. (2015). *pGEM  -T and pGEM  -T Easy Vector Systems Technical Manual*. Obtido em 2 de Dezembro de 2015, de Promega: <https://www.promega.ro/resources/protocols/technical-manuals/0/pgem-t-and-pgem-t-easy-vector-systems-protocol/>
- Punnonen, J. (1989). The role of interleukin 2 in the regulation of proliferation and IgM synthesis of human newborn mononuclear cells. *Clinical Experimental Immunology*, 75, 421-426.
- Punnonen, J., Aversa, G., Cocks, B. G., McKenzie, A. N., Menon, S., Zurawski, G., . . . de Vries, J. E. (1993). Interleukin 13 induces interleukin 4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 3730-3734.
- Puren, A. J., Fantuzzi, G., & Dinarello, C. A. (1999). Gene expression, synthesis, and secretion of interleukin 18 and interleukin 1   are differentially regulated in human blood mononuclear cells and mouse spleen cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 2256-2261.
- Rabinowich, H., Herbermann, R. B., & Whiteside, T. L. (1993). Differential effects of IL12 and IL2 on expression and function of cellular adhesion molecules on purified human natural killer cells. *Cell Immunology*, 152, 481-498.
- Rafaeli, Y., Van Parijs, L., London, C. A., Tschopp, J., & Abbas, A. K. (1998). Biochemical mechanisms of IL-2-regulated Fas-mediated T cell apoptosis. *Immunity*, 8, 615-623.
- Real-time PCR handbook; Applied Biosystems*. (2012). Life Technologies.
- Reddy, M. L., Dierauf, L. A., & Gulland, F. M. (2001). Marine Mammals as Sentinels of Ocean Health. In L. A. Dierauf, & F. M. Gulland, *CRC Handbook of Marine Mammal Medicine (Second Edition)* (pp. 3-13). Boca Raton, Florida, USA: CRC Press.
- Rennick, D., Hunte, B., Holland, G., & Thompson-Snipes, L. (1995). Cofactors are essential for stem cell factor-dependent growth and maturation of mast cell progenitors: comparative effects of interleukin-3 (IL-3), IL-4, IL-10, and fibroblasts. *Blood*, 85, 57-65.
- Resolu  o do Conselho de Ministros n   12/2014. (s.d.). de 12 de Dezembro Di  rio da Rep  blica n   237 - I S  rie. Presid  ncia do Conselho de Ministros.
- Resolu  o do Conselho de Ministros n   163/2006. (s.d.). de 12 de Fevereiro Di  rio da Rep  blica n   30 - I S  rie. Presid  ncia do Conselho de Ministros.
- Ridker, P. M., Rifai, N., Pfeffer, M., Sacks, F., Lepage, S., & Braunwald, E. (2000). Elevation of tumor necrosis factor-alpha and increased risk of recurrent coronary events after myocardial infarction. *Circulation*, 2149-2153.
- Rinc  n, M., Anguita, J., Nakamura, T., Fikrig, E., & Flavell, R. A. (1997). Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4+ T cells. *The Journal of experimental medicine*, 185, 461-469.
- Rissoan, M. C., Soumelis, V., Kadowaki, N., Grouard, G., Briere, F., de Waal Malefyt, R., & Liu, Y. J. (1999). Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science*, 283, 1183-1186.
- Robb, R. J., & Smith, K. A. (1981). Heterogeneity of human T-cell growth factor(s) due to variable glycosylation. *Molecular Immunology*, 18, 1087-1094.

- Robertson, M. J., Soiffer, R. J., Wolf, S. F., Manley, T. J., Donahue, C., Young, D., . . . Ritz, J. (1992). Response of human natural killer (NK) cells to NK cell stimulatory factor (NKSF): Cytolytic activity and proliferation of NK cells are differentially regulated by NKSF. *The Journal Of Experimental Medicine*, 175, 779-788.
- Rollins, B. J., & Pober, J. S. (1991). Interleukin-4 induces the synthesis and secretion of MCP-1/JE by human endothelial cells. *The American journal of pathology*, 138, 1315-1319.
- Rousset, F., Garcia, E., Defrance, T., Péronne, C., Vezzio, N., Hsu, D.-H., . . . Banchereau, J. (1992). Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, 1890-1893.
- Rowbottom, A. W., Lepper, M. W., Garland, R. J., Cox, C. V., Corley, E. G., Oakhill, A., & Steward, C. G. (1999). Interleukin-10-induced CD8 cell proliferation. *Immunology*, 98, 80-89.
- Roy, M., Waldschmidt, T., Aruffo, A., Ledbetter, J., & Noelle, R. J. (1993). The regulation of the expression of gp39, the CD40 ligand, on normal cloned CD4+ cells. *The Journal of Immunology*, 151, 2497-2510.
- Ruef, C., Budde, K., Lacy, J., Northemann, W., Baumann, M., Sterzel, R. B., & Coleman, D. L. (1990). Interleukin 6 is an autocrine growth factor for mesangial cells. *Kidney*, 38, 249-257.
- Rungcun, Y., Maes, H., Corsi, M., Dellner, F., Wen, T., & Kiessling, R. (1998). Interferon gamma impairs the ability of monocyte-derived dendritic cells to present tumour-specific antigens and reduces their expression of CD1A, CD80 and CD4. *Cytokine*, 10, 747-755.
- Ruzek, M. C., Miller, A. H., Opal, S. M., Pearce, B. D., & Biron, C. A. (1997). Characterization of Early Cytokine Responses and an Murine Cytomegalovirus Infection. *The Journal of Experimental Medicine*, 185, 1185-1192.
- Sallusto, F., & Lanzavecchia, A. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *The Journal of Experimental Medicine*, 179, 1109-1118.
- Salmon, M., Kitas, G. D., Gaston, J. S., & Bacon, P. A. (1988). Interleukin-2 production and response by helper T-cell subsets in man. *Immunology*, 65, 81-85.
- Samad, T. A., Moore, K. A., Sapirstein, A., Billet, S., Allchorne, A., Poole, S., . . . Woolf, C. J. (2001). Interleukin-1beta-mediated induction of Cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *Nature*, 410, 471-475.
- Saraya, K. A., & Balkwill, F. R. (1993). Temporal sequence and cellular origin of interleukin-2 stimulated cytokine gene expression. *British journal of cancer*, 67, 514-521.
- Sasaki, K., Pardee, A. D., Qu, Y., Zhao, X., Ueda, R., Kohanbash, G., . . . Storkus, W. J. (2009). IL-4 suppresses very late antigen-4 expression which is required for therapeutic Th1 T-cell trafficking into tumors. *Journal of Immunotherapy*, 32, 793-802.
- Sato, A., Ohtaki, H., Tsumuraya, T., Song, D., Ohara, K., Asano, M., . . . Shioda, S. (2012). Interleukin-1 participates in the classical and alternative activation of microglia/macrophages after spinal cord injury. *Journal of Neuroinflammation*, 9(65).
- Sauerwein, R. W., van der Meer, W. G., Dräger, A., & Aarden, L. A. (1985). Interleukin 2 induces T cell-dependent IgM production in human B cells. *European Journal of Immunology*, 15, 611-616.
- Schandené, L., Alonso-Vega, C., Willems, F., Gerard, C., Delvaux, A., Velu, T., . . . Goldman, M. (1994). B7/CD28-dependent IL-5 production by human resting T cells is inhibited by IL-10. *The Journal of Immunology*, 152, 4368-4374.
- Schandené, L., Del Prete, G. F., Cogan, E., Stordeur, P., Crusiaux, A., Kennes, B., . . . Goldman, M. (1996). Recombinant interferon-alpha selectively inhibits the production of interleukin-5 by human CD4+ T cells. *The Journal of clinical investigation*, 97, 309-315.
- Schindler, R., Gelfand, J. A., & Dinarello, C. A. (1990b). Recombinant C5a stimulates transcription rather than translation of IL-1 and TNF; cytokine induced by LPS, IL-1 or PMA. *Blood*, 76, 1631-1638.

- Schindler, R., Ghezzi, P., & Dinarello, C. A. (1990a). IL-1 induces IL-1. IV. IFN-gamma suppresses IL-1 but not lipopolysaccharide-induced transcription of IL-1. *The Journal of Immunology*, *144*, 2216-2222.
- Schindler, R., Mancilla, J., Endres, S., Ghorbani, R., Clark, S. C., & Dinarello, C. A. (1990c). Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1, and tumor necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. *Blood*, *75*, 40-47.
- Schmidt, J., Fleissner, S., Heimann-Weitschat, I., Lindstaedt, R., & Szelenyi, I. (1994). Histamine increases anti-CD3 induced IL-5 production of TH2-type T cells via histamine H2-receptors. *Agents and Actions*, *42*, 81-85.
- Schoenhaut, D. S., Chua, A. O., Wolitzky, A. G., Quinn, P. M., Dwyer, C. M., McComas, W., . . . Gubler, U. (1992). Cloning and expression of murine IL-12. *The Journal of Immunology*, *148*, 3433-3440.
- Schwenger, G. T., Mordvinov, V. A., Fournier, R., Czabotar, P., Peroni, S., & Sanderson, C. J. (2000). IL-5. In M. Feldmann, S. Durum, T. Hirano, J. Vilcek, N. Nicola, & J. J. Oppenheim, *Cytokine Reference: A Compendium of Cytokines and Other Mediators of Host Defense* (pp. 861-875). Waltham: Academic Press.
- Seder, R. A., Germain, R. N., Linsley, P. S., & Paul, W. E. (1994). CD28-mediated costimulation of interleukin 2 (IL-2) production plays a critical role in t cell priming for il-4 and interferon gamma production. *The Journal of Experimental Medicine*, *179*, 299-304.
- Seder, R. A., Marth, T., Sieve, M. C., Strober, W., Letterio, J. J., Roberts, A. B., & Kelsall, B. (1998). Factors Involved in the Differentiation of TGF-beta-Producing Cells from Naive CD4+ T Cells: IL-4 and IFN-gama have opposing effects, while TGF-beta positively regulates its own production. *The Journal of Immunology*, *160*, 5719-5728.
- Sempowski, G. D., Derdak, S., & Phipps, R. P. (1996). Interleukin-4 and Interferon-γ discordantly regulate collagen biosynthesis by functionally distinct lung fibroblast subsets. *Journal of Cellular Physiology*, *167*, 290-296.
- Serbina, N. V., Salazar-Mather, T. P., Biron, C. A., Kuziel, W. A., & Pamer, E. G. (2003). TNF/iNOS-Producing Dendritic Cells Mediate Innate Immune Defense against Bacterial Infection. *Immunity*, *19*, 59-70.
- Shankaran, V., & Schreiber, R. D. (2000). IFNγ Receptor. In M. Feldmann, S. Durum, T. Hirano, J. Vilcek, N. Nicola, & J. J. Oppenheim, *Cytokine Reference: A Compendium of Cytokines and Other Mediators of Host Defense* (pp. 1819-1837). Waltham: Academic Press.
- Sieburth, D., Jabs, E. W., Warrington, J. A., Li, X., Lasota, J., LaForgia, S., . . . Wolf, S. F. (1992). Assignment of genes encoding a unique cytokine (IL12) composed of two unrelated subunits to chromosomes 3 and 5. *Genomics*, *14*, 59-62.
- Silva, A. T., & Cohen, J. (1994). Role of interferon-gamma in experimental gram-negative sepsis. *The Journal of Infectious Diseases*, *166*, 331-335.
- Sironi, M., Sciacca, F. L., Matteucci, C., Conni, M., Vecchi, A., Bernasconi, S., . . . Mantovani, A. (1994). Regulation of endothelial and mesothelial cell function by interleukin-13: selective induction of vascular cell adhesion molecule-1 and amplification of interleukin-6 production. *Blood*, *84*, 1913-1922.
- Sitt, T., Bowen, L., Blanchard, M. T., Gershwin, L. J., Byrne, B. A., Dold, C., . . . Stott, J. L. (2010). Cellular immune responses in cetaceans immunized with a porcine erysipelas vaccine. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *137*, 181-189.
- Skinninger, B. F., Elia, A. J., Gascoyne, R. D., Trümper, L. H., von Bonin, F., Kapp, U., . . . Mak, T. W. (2001). Interleukin 13 and interleukin 13 receptor are frequently expressed by Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood*, *97*, 250-255.
- Skok, J., Poudrier, J., & Gray, D. (1999). Dendritic cell-derived IL-12 promotes B cell induction of TH2 differentiation: a feedback regulation of TH1 development. *The Journal of Immunology*, *163*, 4284-4291.
- Smart, S. J., & Casale, T. B. (1994). TNF-alpha-induced transendothelial neutrophil migration is IL-8 dependent. *The American journal of physiology*, *266*, L238-245.

- Smeland, E. B., Blomhoff, H. K., Funderud, S., Shalaby, M. R., & Espevik, T. (1989). Interleukin 4 induces selective production of interleukin 6 from normal human B lymphocytes. *The Journal of Experimental Medicine*, 170, 1463-1468.
- Smith, K. A. (2000). IL-2 Receptor. In M. Feldmann, S. Durum, T. Hirano, J. Vilcek, N. Nicola, & J. J. Oppenheim, *Cytokine Reference: A Compendium of Cytokines and Other Mediators of Host Defense* (pp. 1459-1469). Waltham: Academic Press.
- Smith, T. J., Ducharme, L. A., & Weis, J. H. (1994). Preferential expression of interleukin-12 or interleukin-4 by murine bone marrow mast cells derived in mast cell growth factor or interleukin-3. *European Journal of Immunology*, 24, 822-826.
- Snijdewint, F. G., Kalinski, P., Wierenga, E. A., Bos, J. D., & Kapsenberg, M. L. (1993). Prostaglandin E2 differentially modulates cytokine secretion profiles of human T helper lymphocytes. *The Journal of Immunology*, 150, 5321-5329.
- Sociedade Portuguesa de Vida Selvagem [SPVS]. (2015). *Unidades*. Obtido em 4 de Setembro de 2015, de Sociedade Portuguesa de Vida Selvagem: <http://socpvs.org/unidades.php>
- Spangelo, B. L., Farrimond, D. D., Pompilius, M., & Bowman, K. L. (2000). Interleukin-1 beta and thymic peptide regulation of pituitary and glial cell cytokine expression and cellular proliferation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 917, 597-607.
- Spangelo, B. L., Judd, A. M., Isakson, P. C., & Macleod, R. M. (1989). Interleukin-6 stimulates anterior pituitary hormone release in vitro. *Endocrinology*, 125, 575-577.
- Spits, H., Yssel, H., Takebe, Y., Arai, N., Yokota, T., Lee, F., . . . de Vries, J. E. (1987). Recombinant interleukin 4 promotes the growth of human T cells. *The Journal of Immunology*, 139, 1142-1147.
- Spooner, C. E., Markowitz, N. P., & Saravolatz, L. D. (1992). The role of tumor necrosis factor in sepsis. *Clinical immunology and immunopathology*, 62, S11-S17.
- Standiford, T. J., Kunkel, S. L., Liebler, J. M., Burdick, M. D., Gilbert, A. R., & Strieter, R. M. (1993). Gene Expression of Macrophage Inflammatory Protein-1 α from Human Blood Monocytes and Alveolar Macrophages Is Inhibited by Interleukin-4. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 9, 192-198.
- Standiford, T. J., Strieter, R. M., Kasahara, K., & Kunkel, S. L. (1990). Disparate regulation of interleukin 8 gene expression from blood monocytes, endothelial cells, and fibroblasts by interleukin 4. *Biochemical and Biophysical research communications*, 171, 531-536.
- Steffler, A., Hopkins, S. J., Rothwell, N. J., & Luheshi, G. N. (1996). The role of TNF-alpha in fever: opposing actions of human and murine TNF-alpha and interactions with IL-beta in the rat. *British Journal of Pharmacology*, 118, 1919-1924.
- Stein, N. C., Kreutzmann, C., Zimmermann, S.-P., Niebergall, U., Hellmeyer, L., Goettsch, C., . . . Hofbauer, L. C. (2008). Interleukin-4 and interleukin-13 stimulate the osteoclast inhibitor osteoprotegerin by human endothelial cells through the STAT6 pathway. *Journal of bone and mineral research*, 23, 750-758.
- Stewart, J. R., Gast, R. J., Fujioka, R. S., Solo-Gabriele, H. M., Meschke, J. S., Amaral-Zettler, L. A., . . . Holland, F. (2008). The coastal environment and human health: microbial indicators, pathogens, sentinels and reservoirs. *Environmental health*.
- Suberville, S., Bellocq, A., Pequillet, I., Lantz, O., Stordeur, P., Fouqueray, B., & Baud, L. (2001). Transforming growth factor-beta inhibits interleukin-10 synthesis by human monocytic cells. *European Cytokine Network*, 12, 141-146.
- Sundstedt, A., O'Neill, E. J., Nicolson, K. S., & Wraith, D. C. (2003). Role for IL-10 in suppression mediated by peptide-induced regulatory T cells in vivo. *The Journal of Immunology*, 170, 1240-1248.
- Sutterwala, F. S., Noel, G. J., Salgame, P., & Mosser, D. M. (1998). Reversal of proinflammatory responses by ligating the macrophage Fc γ receptor type I. *The Journal of experimental medicine*, 188, 217-222.
- Suzuki, R., Handa, K., Itoh, K., & Kumagai, K. (1983). Natural killer (NK) cells as a responder to interleukin 2 (IL 2): I. Proliferative response and establishment of cloned cells. *The Journal of Immunology*, 130, 981-987.
- Suzuki, T., Tahara, H., Narula, S., Moore, K. W., Robbins, P. D., & Lotze, M. T. (1995). Viral interleukin 10 (IL-10), the human herpes virus 4 cellular IL-10 homologue, induces

- local anergy to allogeneic and syngeneic tumors. *The Journal of experimental medicine*, 182, 477-486.
- Svitek, N., & von Messling, V. (2007). Early cytokine mRNA expression profiles predict Morbillivirus disease outcome in ferrets. *Virology*, 362, 404-410.
- Takanaski, S., Nonaka, R., Xing, Z., O'Byrne, P., Dolovich, J., & Jordana, M. (1994). Interleukin 10 inhibits lipopolysaccharide-induced survival and cytokine production by human peripheral blood eosinophils. *The Journal of experimental medicine*, 180, 711-715.
- Tanaka, T., Hu-Li, J., Seder, R. A., de St. Groth, B. F., & Paul, W. E. (1993). Interleukin 4 suppresses interleukin 2 and interferon gamma production by naive T cells stimulated by accessory cell-dependent receptor engagement. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 5914-5918.
- Tanaka, Y., Saito, K., Shirakawa, F., Ota, T., Suzuki, H., Eto, S., & Yamashita, U. (1988). Production of B cell-stimulatory factors by B cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Journal of Immunology*, 141, 3043-3049.
- Taylor, M. W., & Feng, G. (1991). Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism. *The FASEB Journal*, 5, 2516-2522.
- te Velde, A. A., Huijbens, R. J., Heije, K., de Vries, J. E., & Figdor, C. G. (1990). Interleukin-4 (IL-4) inhibits secretion of IL-1 beta, tumor necrosis factor alpha, and IL-6 by human monocytes. *Blood*, 76, 1392-1397.
- Teloni, R., Giannoni, F., Rossi, P., Nisini, R., & Gagliardi, M. C. (2007). Interleukin-4 inhibits cyclo-oxygenase-2 expression and prostaglandin E production by human mature dendritic cells. *Immunology*, 120, 83-89.
- Tesch, G. H., Lan, H. Y., Atkins, R. C., & Nikolic-Paterson, D. J. (1997). Role of interleukin-1 in mesangial cell proliferation and matrix deposition in experimental mesangioproliferative nephritis. *The American journal of pathology*, 151, 141-150.
- Thivierge, M., Parent, J.-L., Stankova, J., & Rola-Pleszczynski, M. (1999). Modulation of formyl peptide receptor expression by IL-10 in human monocytes and neutrophils. *The Journal of Immunology*, 162, 3590-3595.
- Tilg, H., Trehu, E., Atkins, M. B., Dinarello, C. A., & Mier, J. W. (1994). Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55. *Blood*, 83, 113-118.
- Tizard, I. R. (2009). *Imunologia Veterinária: Uma Introdução* (8ª ed.). (R. S. de Oliveira, Trad.) Rio de Janeiro: Elsevier.
- Tominaga, A., Takahashi, T., Kikuchi, Y., Mita, S., Naomi, S., Harada, N., . . . Takatsu, K. (1990). Role of carbohydrate moiety of IL-5. Effect of tunicamycin on the glycosylation of IL-5 and the biologic activity of deglycosylated IL-5. *The Journal of Immunology*, 144, 1345-1352.
- Twardzik, D. R., Mikovits, J. A., Ranchalis, J. E., Purchio, A. F., Ellingsworth, L., & Ruscetti, F. W. (1990). gamma-Interferon-induced activation of latent transforming growth-factor-beta by human monocytes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 593, 276-284.
- Uehara, A., Kohda, H., Sekiya, C., Takasugi, Y., & Namiki, M. (1989). Inhibition of interleukin-1 beta release from cultured human peripheral blood mononuclear cells by prednisolone. *Experientia*, 45, 166-167.
- Urban, J. L., Shepard, H. M., Rothstein, J. L., Sugarman, B. J., & Schreiber, H. (1986). Tumor necrosis factor: a potent effector molecule for tumor cell killing by activated macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83, 5233-5237.
- Valent, P., Bevec, D., Maurer, D., Besemer, J., Di Padova, F., Butterfield, J. H., . . . Bettelheim, P. (1991). Interleukin 4 promotes expression of mast cell ICAM-1 antigen. *Immunology*, 88, 3339-3342.
- Van Coillie, E., Froyen, G., Noiyama, H., Miura, R., Fiten, P., Van Aelst, I., . . . Opdenakker, G. (1997). Human monocyte chemotactic protein-2: cDNA cloning and regulated expression of mRNA in mesenchymal cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 231, 726-730.

- Van Damme, J., Schaafsma, M. R., Fibbe, W. E., Falkenburg, J. F., Opdenakker, G., & Billiau, A. (1989). Simultaneous production of interleukin 6, interferon- β and colony-stimulating activity by fibroblasts after viral and bacterial infection. *European Journal of Immunology*, 19, 163–168.
- van der Pouw Kraan, T. C., Boeijie, L. C., Smeenk, R. J., Wijdenes, J., & Aarden, L. A. (1995). Prostaglandin-E2 is a potent inhibitor of human interleukin 12 production. *The Journal of experimental medicine*, 181, 775-779.
- van der Pouw Kraan, T. C., Snijders, A., Boeijie, L. C., de Groot, E. R., Alewijnse, A. E., Leurs, R., & Aarden, L. A. (1998). Histamine inhibits the production of interleukin-12 through interaction with H2 receptors. *The Journal of clinical investigation*, 102, 1866-1873.
- Vankelecom, H., Carmeliet, P., Heremans, H., Van Damme, J., Dijkmans, R., Billiau, A., & Deneef, C. (1990). Interferon-gamma inhibits stimulated adrenocorticotropin, prolactin, and growth hormone secretion in normal rat anterior pituitary cell cultures. *Endocrinology*, 126, 2919-2926.
- Vannier, E., Miller, L. C., & Dinarello, C. A. (1992). Coordinated antiinflammatory effects of interleukin 4: interleukin 4 suppresses interleukin 1 production but up-regulates gene expression and synthesis of interleukin 1 receptor antagonist. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, 4076-4080.
- Verweij, C. L., Geerts, M., & Aarden, L. A. (1991). Activation of interleukin-2 gene transcription via the T-cell surface molecule CD28 is mediated through an NF- κ B-like response element. *The Journal of Biological Chemistry*, 266, 14179-14182.
- Vila-del Sol, V., Punzón, C., & Fresno, M. (2008). IFN- γ -Induced TNF- α Expression Is Regulated by Interferon Regulatory Factors 1 and 8 in Mouse Macrophages. *The Journal of Immunology*, 181, 4461-4470.
- Volpert, O. V., Fong, T., Koch, A. E., Peterson, J. D., Waltenbaugh, C., Tepper, R. I., & Bouck, N. P. (1998). Inhibition of angiogenesis by interleukin 4. *The Journal of experimental medicine*, 188, 1039-1046.
- Waage, A., Slupphaug, G., & Shalaby, R. (1990). Glucocorticoids inhibit the production of IL 6 from monocytes, endothelial cells and fibroblasts. *European Journal of Immunology*, 20, 2439-2443.
- Wang, C. Q., Udupa, K. B., & Lipschitz, D. A. (1995). Interferon- γ exerts its negative regulatory effect primarily on the earliest stages of murine erythroid progenitor cell development. *Journal of Cellular Physiology*, 162, 134-138.
- Wang, J. M., Walter, S., & Mantovani, A. (1990). Re-evaluation of the chemotactic activity of tumour necrosis factor for monocytes. *Immunology*, 71, 364-367.
- Wanidworanun, C., & Strober, W. (1993). Predominant role of tumor necrosis factor- α in human monocyte IL-10 synthesis. *The Journal of Immunology*, 151, 6853-6861.
- Ward, L. D., Howlett, G. J., Discolo, G., Yasukawa, K., Hammacher, A., Moritz, R. L., & Simpson, R. J. (1994). High affinity interleukin-6 receptor is a hexameric complex consisting of two molecules each of interleukin-6, interleukin-6 receptor, and gp-130. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 23286-23289.
- Warren, H. S., Kinnear, B. F., Philips, J. H., & Lanier, L. L. (1995). Production of IL-5 by human NK cells and regulation of IL-5 by human NK cells and regulation of secretion by IL-4, IL-10, and IL-12. *The Journal of Immunology*, 154, 5144-5152.
- Watanabe, Y., & Jacob, C. O. (1991). Regulation of MHC Class II antigen expression. Opposing effects of tumor necrosis factor- α on IFN- γ -induced HLA-DR and Ia expression depends on the maturation and differentiation stage of the cell. *The Journal of Immunology*, 146, 899-905.
- Willems, F., Marchant, A., Delville, J.-P., Gérard, C., Delvaux, A., Velu, T., . . . Goldman, M. (1994). Interleukin-10 inhibits B7 and intercellular adhesion molecule-1 expression on human monocytes. *European Journal of Immunology*, 24, 1007–1009.
- Woerly, G., Roger, N., Loiseau, S., & Capron, M. (1999). Expression of Th1 and Th2 immunoregulatory cytokines by human eosinophils. *International Archives of Allergy and Immunology*, 118, 95-97.
- Xiang, S. D., Benson, E. M., & Dunn, I. S. (2001). Tracking membrane and secretory immunoglobulin alpha heavy chain mRNA variation during B-cell differentiation by

- real-time quantitative polymerase chain reaction. *Immunology and cell biology*, 79, 472-481.
- Yamaguchi, Y., Hayashi, Y., Sugama, Y., Miura, Y., Kasahara, T., Kitamura, S., . . . Suda, T. (1988). Highly purified murine interleukin 5 (IL-5) stimulates eosinophil function and prolongs in vitro survival. IL-5 as an eosinophil chemotactic factor. *The Journal of Experimental Medicine*, 167, 1737-1742.
- Yang, H., Ko, H.-J., Yang, J.-Y., Kim, J.-J., Seo, S.-U., Park, S. G., . . . Kweon, M.-N. (2013). Interleukin-1 Promotes Coagulation, Which Is Necessary for Protective Immunity in the Lung Against *Streptococcus pneumoniae* Infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 207, 50-60.
- Yano, S., Banno, T., Walsh, R., & Blumenberg, M. (2008). Transcriptional responses of human epidermal keratinocytes to cytokine interleukin-1. *Journal of cellular physiology*, 214, 1-13.
- Yao, Y., Li, W., Kaplan, M. H., & Chang, C.-H. (2005). Interleukin (IL)-4 inhibits IL-10 to promote IL-12 production by dendritic cells. *The Journal of experimental medicine*, 201, 1899-1903.
- Yasukawa, K., Hirano, T., Watanabe, Y., Muratani, K., Matsuda, T., Nakai, S., & Kishimoto, T. (1987). Structure and expression of human B cell stimulatory factor-2 (BSF-2/IL-6) gene. *The EMBO Journal*, 2939-2945.
- Yeaman, G. R., Collins, J. E., Currie, J. K., Guyre, P. M., Wira, C. R., & Fanger, M. W. (1998). IFN-gamma is produced by polymorphonuclear neutrophils in human uterine endometrium and by cultured peripheral blood polymorphonuclear neutrophils. *The Journal of immunology*, 160, 5145-5153.
- Yoshimoto, T., Takeda, K., Tanaka, T., Ohkusu, K., Kashiwamura, S., Okamura, H., & Nakanishi, K. (1998). IL-12 upregulates IL-18 receptor expression on T cells, TH1 cells, and B cells: synergism with IL-18 for IFN-gamma production. *The Journal of Immunology*, 161, 3400-3407.
- Yu, C. L., Huang, M. H., Kung, Y. Y., Tsai, C. Y., Tsai, S. T., Huang, D. F., . . . Yu, H. S. (1998). Interleukin-13 increases prostaglandin E2 (PGE2) production by normal human polymorphonuclear neutrophils by enhancing cyclooxygenase 2 (COX-2) gene expression. *Inflammation Research*, 47, 167-173.
- Zelante, T., Fric, J., Wong, A. Y., & Ricciardi-Castagnoli, P. (2012). Interleukin-2 Production by Dendritic Cells and its Immuno-Regulatory Functions. *Frontiers in Immunology*, 3, 1-5.
- Zepter, K., Häffner, A., Soohoo, L. F., De Luca, D., Tang, H. P., Fisher, P., . . . Elmets, C. A. (1997). Induction of biologically active IL-1 beta-converting enzyme and mature IL-1 beta in human keratinocytes by inflammatory and immunologic stimuli. *The Journal of Immunology*, 159, 6203-6208.
- Zhang, J., Scordi, I., Smyth, M. J., & Lichtenheld, M. G. (1999). Interleukin 2 Receptor Signaling Regulates the Perforin Gene (Stat) 5 Activation of Two Enhancers. *The Journal of Experimental Medicine*, 190, 1297-1307.
- Zhao, R. Z., Chen, X., Yao, Q., & Chen, C. (2005). TNF-alpha induces interleukin-8 and endothelin-1 expression in human endothelial cells with different redox pathways. *Biochemical and biophysical research communications*, 327, 985-992.
- Zhao, S., & Fernald, R. D. (2005). Comprehensive Algorithm for Quantitative. *Journal of Computational Biology*, 12, 1047-1064.
- Zheng, L. M., Ojcius, D. M., Garaud, F., Roth, C., Maxwell, E., Li, Z., . . . King, I. (1996). Interleukin-10 inhibits tumor metastasis through an NK cell-dependent mechanism. *The Journal of experimental medicine*, 184, 579-584.
- Zhou, F. (2009). Molecular mechanisms of IFN-gamma to up-regulate MHC class I antigen processing and presentation. *International Reviews of Immunology*, 28, 239-260.
- Zhu, Z., Homer, R. J., Wang, Z., Chen, Q., Geba, G. P., Wang, J., . . . Elias, J. A. (1999). Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. *Journal of Clinical Investigation*, 103, 779-788.

- Zubler, R. H., Lowenthal, J. W., Erard, F., Hashimoto, N., Devos, R., & MacDonald, H. R. (1984). Activated B cells express receptors for, and proliferate in response to, pure interleukin 2. *The Journal of Experimental Medicine*, 160, 1170-1183.
- Zünd, G., Madara, J. L., Dzus, A. L., Awtrey, C. S., & Colgan, S. P. (1996). Interleukin-4 and interleukin-13 differentially regulate epithelial chloride secretion. *The Journal of biological chemistry*, 271, 7460-7464.

ANEXOS

ANEXO 1 – Fichas de necropsias

Ficha de necropsias - Pulmões

Animal	Alterações nos Pulmões	Parasitas
DD-167-2012	Hemorragicos	0
DD-295-2012	Hemorragia; Material granuloso	1
DD-151-2013	Pneumodocimásia negativo	0
DD-207-2013	Petéquias	0
DD-208-2013	Sai sangue e espuma ao corte	0
DD-216-2013	Edema severo e hiperémia com zonas de pneumonia Pulmão hepatizado	0
DD-183-2014	Tingido de sangue Sai espuma ao corte	0
DD-184-2014	Pequenos quistos de parasitas com reacção de fibrina Sai sangue e espuma ao corte Hemorragicos	1
DD-202-2014	Direito tingido de sangue Sai sangue ao corte	0
DD-212-2014	Hemorragicos Sai sangue ao corte	0
DD-230-2014	Petéquias Edema Sai espuma ao corte	0
DD-238-2014	Petéquias Sai sangue ao corte	0
DD-239-2014	Sem alterações	0
DD-240-2014	Sai sangue e espuma ao corte Tingido de sangue	1
DD-272-2014	Espuma	0

Ficha de Necropsias - Linfonodo Pulmonar

Animal	Alterações no Linfonodo pulmonar
DD-167-2012	Tingido de sangue
DD-295-2012	Tingido de sangue
DD-151-2013	Sem alterações
DD-207-2013	Reativos
DD-208-2013	Sem alterações
DD-216-2013	reativos e aumentados e heterogéneos
DD-183-2014	Sem alterações
DD-184-2014	Reativos
DD-202-2014	Sem alterações
DD-212-2014	Tingido de sangue
DD-230-2014	Sem alterações
DD-238-2014	Heterogéneos
DD-239-2014	Ponteados pretos
DD-240-2014	Edemaciados
DD-272-2014	Sem alterações

ANEXO 2 - Amostras de Animais Positivos a CeMV

ID Animal	Origem	Armazenamento	Órgãos recolhidos
dd191	Portugal	-20° C com RNA later	R, F, P, LN, C, O
sc290	Portugal	-20° C com RNA later	R, F, P, LN, C, O
sc302	Portugal	-20° C com RNA later	R, F, P, LN, C, O
sc193	Portugal	-20° C com RNA later	R, F, P, LN, C, O
sc221	Portugal	-20° C com RNA later	R, P, LN, C, O
sc11	Portugal	-20° C com RNA later	R, F, P, LN, C, O
scg49	Galiza	-20° C sem RNA later	P
scg53	Galiza	-20° C sem RNA later	P
scg55	Galiza	-20° C sem RNA later	P
scg21	Galiza	-20° C sem RNA later	P
scg31	Galiza	-20° C sem RNA later	P
scg42	Galiza	-20° C sem RNA later	P

Legenda: R=Rim; F=Fígado; P=Pulmão; LN=Linfonodo; C=Cérebro; O=Outros;
sc=Stenella coeruleoalba; dd=Delphinus delphis

ANEXO 3 – Tabelas das eficiências

Eficiência dos Primers RPL7

Log (Nº cópias/mL)	Nº cópias/mL	Ct1	Ct2	Média	Desvio Padrão
10,74303714	55339743416	6,204536	6,287976742	6,246256	0,059001543
9,743037141	5533974342	8,00174	8,002791405	8,002266	0,000743808
8,743037141	553397434,2	11,0985	11,04226971	11,07039	0,039763696
7,743037141	55339743,42	14,57682	14,71183491	14,64433	0,095467672
6,743037141	5533974,342	17,82881	17,95025826	17,88953	0,085877068
5,743037141	553397,4342	21,4211	21,51363564	21,46737	0,065432139
4,743037141	55339,74342	24,76925	24,92342758	24,84634	0,109016702
3,743037141	5533,974342	28,26856	28,58158302	28,42507	0,221337721
2,743037141	553,3974342	32,18443	31,3823204	31,78338	0,567179263
1,743037141	55,33974342	34,91453		34,91453	

Eficiência dos Primers TNFalfa

Log (Nº cópias/mL)	Nº cópias/mL	Ct1	Ct2	Média	Desvio Padrão
9,726727209	5330000000	5,730077744	5,999458790	5,864768267	0,190481165
8,726727209	533000000	6,991698742	7,008101940	6,999900341	0,011598813
7,726727209	53300000	10,444009781	10,332350731	10,388180256	0,078954871
6,726727209	5330000	13,899503708	13,934113503	13,916808605	0,02447282
5,726727209	533000	17,549860001	17,571765900	17,560812950	0,01548981
4,726727209	53300	21,295509338	21,180273056	21,237891197	0,081484357
3,726727209	5330	25,125013351	24,932693481	25,028853416	0,135990684
2,726727209	533	28,296422958	28,383708954	28,340065956	0,061720519
1,726727209	53,3	32,291835785	32,253330231	32,272583008	0,027227538
0,726727209	5,33	40,518119812	34,546974182	37,532546997	4,222237566

Eficiência dos Primers IL-6

Log (Nº cópias/mL)	Nº cópias/mL	Ct1	Ct2	Média	Desvio Padrão
9,913721302	8198252728	6,935854912	6,544717789	6,740286	0,276575712
8,913721302	819825272,8	7,750976086	7,839447021	7,795212	0,062558399
7,913721302	81982527,28	11,87132931	11,21591377	11,54362	0,463448769
6,913721302	8198252,728	14,89949417	14,96947479	14,93448	0,049483772
5,913721302	819825,2728	18,65826035	18,74629784	18,70228	0,062251907
4,913721302	81982,52728	22,51683807	22,55880928	22,53782	0,029678125
3,913721302	8198,252728	25,92910194	25,92256737	25,92583	0,004620643
2,913721302	819,8252728	29,57790947	29,77300262	29,67546	0,137951693
1,913721302	81,98252728	33,53318024	33,98854446	33,76086	0,321991133
0,913721302	8,198252728	35,62266541	40,66027069	38,14147	3,562124858

Eficiência dos Primers IL-4

Log (Nº cópias/mL)	Nº cópias/mL	Ct1	Ct2	Média	Desvio Padrão
6,129778	1348275	6,458159	6,614621	6,53639	0,110635
5,129778	134827,5	9,529108	9,462544	9,495827	0,047068
4,129778	13482,75	13,29129	13,31659	13,30394	0,017894
3,129778	1348,275	16,74003	16,53504	16,63753	0,144953
2,129778	134,8275	19,55875	19,56838	19,56356	0,006808
1,129778	13,48275	22,84304	22,7524	22,79772	0,064097
0,129778	1,348275	26,77302	26,42689	26,59996	0,244747
-0,87022	0,134827	30,25855	29,85097	30,05476	0,288204
-1,87022	0,013483	34,8024	32,23911	33,52075	1,812522

Eficiência dos Primers IL-10

Log (Nº cópias/mL)	Nº cópias/mL	Ct1	Ct2	Média	Desvio Padrão
9,488116	3076917030	6,909294	6,97783	6,943562	0,048462
8,488116	307691703	8,596148	8,563499	8,579823	0,023086
7,488116	30769170,3	11,51831	11,45429	11,4863	0,045272
6,488116	3076917,03	14,26704	14,31167	14,28935	0,031554
5,488116	307691,703	18,05661	17,63654	17,84658	0,297036
4,488116	30769,1703	21,51003	21,58423	21,54713	0,052467
3,488116	3076,91703	25,24784	25,00446	25,12615	0,172101
2,488116	307,691703	28,09512	27,89777	27,99645	0,139549
1,488116	30,7691703	32,95284	31,48599	32,21941	1,037218

ANEXO 4 – Tabela de expressão relativa de citoquinas (Método $2^{-\Delta\Delta Ct}$)

	TNF- α Linfonodo	TNF- α Pulmão	IL-4 Linfonodo	IL-4 Pulmão	IL-6 Linfonodo	IL-6 Pulmão	IL-10 Linfonodo	IL-10 Pulmão
dd167/2012	0,002700077	0,000838582	0,001244103	0,007685895	0,000383071	0,001845198	0,000435029	0,000822929
dd295/2012	0,001717652	0,0012886	0,002117334	x	0,000127193	0,000426742	0,000722692	0,000319038
dd151/2013	0,000471256	0,000694032	0,000132036	0,002097452	0,000111626	0,001993923	0,000512905	x
dd207/2013	0,002647385	x	0,001619777	0,004618702	0,000248382	0,00074674	0,001267158	4,45427E-05
dd208/2013	x	x	0,000807408	0,004956254	0,000790939	0,000232206	0,000727769	0,000688724
dd216/2013	0,010671969	0,001243848	0,000917015	0,001209038	0,000741455	0,000536199	0,000773995	0,000304642
dd183/2014	0,002188314	x	0,001457147	0,01182097	0,000221445	0,001106013	0,001815469	0,000136977
dd184/2014	0,002158797	0,001700453	0,000913622	0,024087839	0,00029256	x	0,00106269	0,000201032
dd212/2014	0,002277864	x	0,00155014	8,53434E-05	0,000308337	0,000492317	0,000406365	x
dd230/2014	0,006186289	0,000326004	0,001722318	0,000264522	0,000330192	0,000943467	0,000538768	x
dd239/2014	0,001523488	0,000605014	0,001782058	0,00295835	0,002208071	0,002390779	0,001608148	0,001569724
dd272/2014	0,004818001	0,00011964	0,001043983	x	0,000285522	0,000461519	0,002014215	x
dd202/2014		x		0,007392815		7,56633E-05		x
dd238/2014		x		0,000145663		0,00051381		0,000611158
dd240/2014		0,004222632		0,000857556		0,000300974		x
Média	0,003396463	0,001104927	0,001275578	0,005244646	0,000504316	0,000861825	0,000990434	0,000522085
Erro Padrão	0,000743456	0,000385758	0,00015649	0,001856119	0,000148894	0,000191984	0,000161933	0,000157749

ANEXO 5 - Expressão relativa de citocinas (Método Miner)

	TNF- α Linfonodo	TNF- α Pulmão	IL-4 Linfonodo	IL-4 Pulmão	IL-6 Linfonodo	IL-6 Pulmão
dd167/2012	0,005263927	0,00048057	0,001471644	0,007423	0,000634695	0,00219814
dd295/2012	0,003750093	0,002063168	0,002934359		0,000309811	0,00093027
dd151/2013	0,001010736	0,000489195	0,000165203	0,0019075	0,00020263	0,00430303
dd207/2013	0,005516575		0,002332083	0,00587203	0,000568432	0,00171697
dd208/2013			0,000835601	0,00577355	0,001208889	0,00047063
dd216/2013	0,014721813	0,001932758	0,000876822	0,00093367	0,001195673	0,00119093
dd183/2014	0,004562514		0,002078067	0,00858356	0,000550862	0,00215998
dd184/2014	0,004445083	0,002622722	0,001037748	0,01645595	0,00055377	
dd212/2014	0,004747287		0,002128656	0,00023932	0,000705395	0,00103828
dd230/2014	0,012050348	0,000210624	0,001966015	0,00027715	0,00054168	0,00130954
dd239/2014	0,002161238	0,000358449	0,001718268	0,00295138	0,00348886	0,00294108
dd272/2014	0,009309373	0,000249911	0,001494251		0,000654826	0,00121704
dd202/2014				0,00794289		0,00101064
dd238/2014				0,00015683		0,00064417
dd240/2014		0,002376447		0,00080987		0,00040112
Média	0,006139908	0,001198205	0,00158656	0,00456359	0,000884627	0,00153799
Erro Padrão	0,001261072	0,000339581	0,000221565	0,00132475	0,000251741	0,00028586

	IL-10 Linfonodo	IL-10 Pulmão	IL-12 Linfonodo	IL-12 Pulmão	IL-1 β Linfonodo	IL-1 β Pulmão
dd167/2012	0,000737128	0,002128503	0,000851998	0,001551275	0,002758072	0,018498863
dd295/2012	0,001064117	0,001000707	0,000552804	0,002663388	0,003936268	0,066803306
dd151/2013	0,000903663		0,000159348		0,006625941	
dd207/2013	0,001966423	0,00015804	0,001750048	0,000760045	0,00116906	0,001693458
dd208/2013	0,001161396	0,001755862	0,001694075		0,001562959	
dd216/2013	0,00068439	0,000710148	0,001135675	0,002680408	0,006499752	0,030322063
dd183/2014	0,002528228	0,000428609	0,001179334	0,003335853	0,002452251	0,002541186
dd184/2014	0,00184782	0,00114426	0,001637345	0,001219536	0,003140613	0,025296942
dd212/2014	0,000574172		9,90E-05		0,005509792	
dd230/2014	0,000961895		0,001313218			
dd239/2014	0,001654039	0,006117765	0,001774036	0,000387393	0,00537718	0,028700373
dd272/2014	0,002742842		0,002075155		0,001367655	
dd202/2014				0,001867961		0,004892581
dd238/2014		0,001633805		0,003258279		0,054579201
dd240/2014				0,016387264		
Média						
Erro Padrão	0,001402176	0,0016753	0,001185173	0,00341114	0,003672686	0,02592533

ANEXO 6 - Análise da normalidade (Método 2^{-ΔΔCt})

	Órgão	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estatística	Graus de liberdade	Significância	Estatística	Graus de liberdade	Significância
TNF-α	Linfonodo	,323	11	,002	,785	11	,006
	Pulmão	,258	9	,087	,771	9	,009
IL-4	Linfonodo	,131	12	,200*	,964	12	,843
	Pulmão	,220	13	,084	,759	13	,002
IL-6	Linfonodo	,333	12	,001	,628	12	,000
	Pulmão	,246	14	,021	,845	14	,019
IL-10	Linfonodo	,234	12	,070	,879	12	,086
	Pulmão	,222	9	,200*	,867	9	,113

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

ANEXO 7 - Análise da normalidade (Método Miner)

	Órgão	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estatística	Graus de liberdade	Significância	Estatística	Graus de liberdade	Significância
TNF-α	Linfonodo	,287	11	,012	,881	11	,108
	Pulmão	,312	9	,012	,805	9	,023
IL-4	Linfonodo	,107	12	,200*	,984	12	,995
	Pulmão	,178	13	,200*	,848	13	,027
IL-6	Linfonodo	,331	12	,001	,625	12	,000
	Pulmão	,227	14	,048	,862	14	,032
IL-10	Linfonodo	,212	12	,142	,900	12	,161
	Pulmão	,289	9	,029	,735	9	,004
IL-12	Linfonodo	,173	12	,200*	,927	12	,351
	Pulmão	,406	10	,000	,576	10	,000
IL-1β	Linfonodo	,162	11	,200*	,907	11	,225
	Pulmão	,201	9	,200*	,903	9	,268

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

ANEXO 8 – Primers que não funcionaram

Gene	Primer	Sequência
IL-10	Forward	5' TTG AGC CAG TCT CTG CTG GA 3'
	Reverse	5' CTT CTC CCC CAG GGA GTT CA 3'
IL-12	Forward	5' CGA ATG AGA GTT GCC TGG CT 3'
	Reverse	5' TGC TAA GGC ACA GGG TCA TC 3'
IL-1 β	Forward	5' GGC ATT TCG TGT CAG TCA TT 3'
	Reverse	5' GCT CTT CAG GTC ATC CTC CT 3'
GADPH	Forward	5' GCC AAA AGG GTC ATC ATC TC 3'
	Reverse	5' GGG GCC ATC CAC AGT CTT CT 3'
18S	Forward	5' CCC CTC GAT GCT CTT AGC TG 3'
	Reverse	5' GAA CCG CGG TCC TAT TCC AT 3'

ANEXO 9 – Abstract do Poster a ser apresentado em Atlanta

HEALTH ASSESSMENT IN FREE ROAMING CETACEANS: DETERMINING BASELINE LEVELS FOR CYTOKINE EXPRESSION IN COMMON DOLPHINS.

Carolina Bento¹, DVM, MSc, ^{1,5*} Pedro Verdelho, UGRD, ¹ Catarina Eira, Biology MSc, PhD, ^{2,5} José Vingada, Biology MSc, PhD, ^{3,5} Marisa Ferreira, Biology MSc, ^{3,5} Luís Tavares, DVM, MSc, PhD, ¹ Ana Duarte, DVM, MSc, PhD¹

¹CIISA, Faculty of Veterinary Medicine, ULisboa; Avenida da Universidade Técnica 1300-477, Lisboa, Portugal; ²Centre for Environmental and Marine Studies (CESAM), University of Aveiro, 3810-193 Aveiro, Portugal; ³Centre for Environmental and Marine Studies, Department of Biology, Minho University, 4710-057 Braga, Portugal; ⁵Portuguese Wildlife Society, Department of Biology, Minho University, 4710-057 Braga, Portugal

Abstract

Cytokines play a key role in the establishment of immune response and are crucial in host immunity during infection and inflammatory processes. These small proteins have the ability to modulate the balance between humoral and cell-based response.² Viral infections are capable of manipulating cytokine expression in order to favor viral success. Recognising reference values for these cytokines in healthy animals is the first step to allow the detection of immunological shifts caused by pathogen infections or stress.¹ For the assessment of baseline values for gene expression cetaceans presented at necropsy were sampled (n=30). These samples were collected from bycaught animals, with no obvious signs of disease at necropsy and negative for cetacean morbillivirus and herpesvirus, recent feeding and good body condition. Specific primers for the amplification of mRNA for cytokines that participate in cellular immunity (IFN- α , TNF α and IL12) and humoral immunity (IL-4, IL-10, IL6 and IL1 β) were designed and RPL7 was selected as a housekeeping gene. Total RNA was extracted from lymphnodes and cDNA was synthesized and used to perform quantitative PCR. CT values for each gene were normalised and used to determine means and standard errors for the cytokines in study. Coefficients of variation for each cytokine were calculated and the baseline values for each gene were assessed for this group. Our results allowed the determination of baseline immunological parameters to be compared with cytokine profile for cetaceans positive to cetacean morbillivirus. These data represent a valuable tool for health assessment in free ranging cetacean populations.

Key words: *Delphinus delphis*, cytokines, free roaming, gene expression, health status, qPCR

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the Portuguese Wildlife Society (SPVS) for assistance with data and sample collection. The authors further thank CIISA at FMV-Ulisboa where the laboratory work was developed.

LITERATURE CITED

1. Müller S, Lehnert K, Seibel H, Driver J, Ronnenberg K, Teilmann J, van Elk C, Kristensen J, Everaarts E, Siebert U. Evaluation of immune and stress status in harbour porpoises (*Phocoena phocoena*): can hormones and mRNA expression levels serve as indicators to assess stress? BMC Vet Res [Internet]. 2013 [cited 2014 Sep 26];9:145. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3734172&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
2. Fenner's Veterinary Virology [Internet]. Fenner's Veterinary Virology. Elsevier; 2011 [cited 2015 Nov 30]. 75-99 p. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123751584000043>